
Markierung postsynaptischer Proteine für
die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES
NATURWISSENSCHAFTLICHEN DOKTORGRADES
DER JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT
WÜRZBURG

vorgelegt von

Franziska Neubert

geboren in Berlin

Würzburg, 2019

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. Markus Sauer

Gutachter: Prof. Dr. med. Christian Geis

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Zusammenfassung

Das menschliche Gehirn ist ein Organ, das aufgrund seiner Komplexität und zellulären Diversität noch am wenigsten verstanden ist. Eine der Ursachen dafür sind zahlreiche Herausforderungen in diversen neurobiologischen Bildgebungsverfahren. Erst seit der Erfindung der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie ist es möglich, Strukturen unterhalb der Beugungsgrenze zu visualisieren und somit eine maximale Auflösung von bis zu 20 nm zu erreichen. Zusätzlich hängt die Fähigkeit, biologische Strukturen aufzulösen, von der Markierungsgröße und -dichte ab. Derzeit ist die häufigste Methode zur Proteinfärbung die indirekte Antikörperfärbung, bei der ein Fluorophor-markierter Sekundärantikörper an einen Epitop-spezifischen Primärantikörper bindet. Dabei kann der Abstand von Zielstruktur und Fluorophor bis zu 30 nm betragen, was eine Auflösungsverminderung zur Folge haben kann. Aufgrund dessen wurden in dieser Arbeit alternative Markierungsmethoden getestet, um postsynaptische Proteine sichtbar zu machen.

Zunächst wurde der postsynaptische *N*-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor mit Hilfe konventioneller indirekter Antikörperfärbung markiert. Hier war die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors von besonderem Interesse, da diese in der Autoimmunerkrankung Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis involviert ist. Patienten dieser seltenen Krankheit bilden Autoantikörper gegen die NR1-Untereinheit, wodurch ein schneller reversibler Verlust der NMDA-Rezeptoren auf der Postsynapse induziert wird. Wichtige Informationen können nicht mehr ausreichend weitergegeben werden, was psychiatrische und neurologische Störungen zur Folge hat. In dieser Arbeit wurden sowohl kommerzielle NR1-Antikörper, als auch rekombinante monoklonale NR1-Antikörper von Patienten mit Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis getestet. In konfokalen und in hochaufgelösten SIM- (engl. *structured illumination microscopy*) und dSTORM- (engl. *direct stochastic optical reconstruction microscopy*) Messungen konnten kommerzielle NR1-Antikörper keine erfolgreichen Färbungen erzielen. Dagegen erwiesen sich die rekombinanten monoklonalen NR1-Patientenantikörper als sehr

spezifisch, sowohl in primären Neuronen als auch im Hippocampus von murinen Gehirnschnitten und lieferten gute Kollokalisierungen mit dem postsynaptischen Markerprotein Homer.

Um die optische Auflösung zu verbessern, wurde eine neue Markierungsmethode mit sog. „Super-Binde-Peptiden“ (SBPs) getestet. SBPs sind modifizierte Peptide, die erhöhte Affinitäten und Spezifitäten aufweisen und mit einer Größe von $\sim 2,5$ nm wesentlich kleiner als Antikörper sind. In dieser Arbeit bestätigte sich ein kleines hochspezifisches SPB, das an den Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodamin (TMR) gekoppelt ist, als effektiver Marker für das Ankerprotein Gephyrin. Gephyrin ist für die Lokalisation und Verankerung einiger postsynaptischer Rezeptoren zuständig, indem es sie mit dem Cytoskelett der Zelle verbindet. SIM-Messungen in primären Neuronen zeigten eine bessere Clusterrepräsentation bei der Färbung von Gephyrin mit SBPs, als mit Antikörperfärbung. Zusätzlich wurden Kollokalisationsanalysen von Gephyrin zusammen mit dem inhibitorischen präsynaptischen vesikulären GABA-Transporter VGAT durchgeführt.

Eine weitere Färbemethode stellte die bioorthogonale Click-Färbung durch die Erweiterung des eukaryotischen genetischen Codes (engl. *genetic code expansion*, GCE) dar. Dabei wurde eine unnatürliche, nicht-kanonische Aminosäure (engl. *non-canonical amino acid*, ncAA) ins Zielprotein eingebaut und in Kombination mit der Click-Chemie ortsspezifisch mit organischen Tetrazin-Farbstoff-Konjugaten angefärbt. Organische Fluorophore haben den Vorteil, dass sie mit einer Größe von 0,5 – 2 nm sehr klein sind und damit die natürlichen Funktionen der Proteine in der Zelle kaum beeinflussen. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass der tetramere postsynaptische NMDA-Rezeptor durch die *Amber*-Suppressionsmethode bioorthogonal angefärbt werden konnte. Aus sieben verschiedenen *Amber*-Mutanten der NR1-Untereinheit stellte sich die Y392TAG-NR1-Mutante als diejenige mit der besten Proteinexpression, Färbefeffizienz und Rezeptorfunktionalität heraus. Dies konnte durch Fluoreszenzmikroskopie- und Whole-Cell Patch-Clamp-Experimenten gezeigt werden. Die bioorthogonale Click-Färbung durch GCE eignete sich für die Färbung des NMDA-Rezeptors in verschiedenen Zelllinien, mit unterschiedlichen Tetrazin-Farbstoff-Konjugaten und für Lebendzellexperimente. In *d*STORM-Messungen erwies sich das Tetrazin-Cy5-Farbstoff-Konjugat als ideal aufgrund seiner Größe, Photostabilität, Helligkeit und seines geeigneten Blinkverhaltens, sodass eine homogene NMDA-Rezeptorverteilung auf der Zellmembran gezeigt werden konnte. NR1-Antikörperfärbungen wiesen dagegen starke Clusterbildungen auf. Die Ergebnisse konnten belegen, dass kleinere Farbstoffe eine deutlich bessere Zugänglichkeit zu ihrem Zielprotein haben und somit besser für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie geeignet sind.

Summary

Due to its complexity and cellular diversity, the human brain is an organ which is poorly understood. In particular, there are numerous challenges in different neurobiological imaging processes. The advent of super-resolution fluorescence microscopy, where a maximal optical resolution of up to 20 nm is achievable, made it feasible to visualize structures beyond the diffraction limit. The ability to resolve biological structures is further dependent on the labeling size and density. Currently, indirect antibody staining is the most common method for protein labeling. Thereby, a fluorophore marked secondary antibody binds an epitope specific primary antibody. Consequently, the off-distance between target structure and fluorophore can be up to 30 nm, which could provoke a decrease of resolution. As a result, alternative labeling methods were tested in this work to visualize postsynaptic proteins.

Initially, labeling of the postsynaptic *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor was performed with conventional indirect antibody staining. Here, the NR1 subunit of the NMDA receptor was of special interest because it is involved in the autoimmune disease of Anti-NMDA receptor encephalitis. Patients of this rare disorder produce autoantibodies against the NR1 subunit, which induces a fast and reversible reduction of NMDA receptors on the postsynapse. Important synaptic information cannot be transferred sufficiently which results in psychiatric and neurological deficiencies. In this work commercial NR1 antibodies as well as recombinant monoclonal NR1 antibodies from patients with Anti-NMDA receptor encephalitis were tested. In confocal and super-resolved SIM (*structured illumination microscopy*) and *d*STORM (*direct stochastic optical reconstruction microscopy*) measurements the commercial NR1 antibodies could not obtain a successful staining. In contrast, recombinant monoclonal NR1 patient antibodies turn out to be very specific, both in primary neurons and in the hippocampus of murine brain slices. Additionally, they show perfect colocalization together with the postsynaptic marker protein Homer.

To further improve the optical resolution, a new labeling method was tested with so called “super-binding peptides” (SBPs). SBPs are modified peptides with enhanced affinity and specificity. With a size of ~ 2.5 nm, they are much smaller than antibodies. In this work a small, highly specific SBP, coupled to the fluorescent dye tetramethylrhodamine (TMR), turned out to be an efficient marker for the postsynaptic anchor protein gephyrin. Gephyrin is responsible for the localization and anchoring of postsynaptic receptors by connecting them with the cytoskeleton of the cell. SIM measurements in primary neurons showed better cluster representation of gephyrin stained with SBPs than with antibody staining. In addition, colocalization analysis of gephyrin together with the inhibitory presynaptic vesicular GABA transporter VGAT was performed.

Another staining method was the bioorthogonal click chemistry by the eukaryotic genetic code expansion (GCE). Thereby, an unnatural, non-canonical amino acid (ncAA) is incorporated into the target protein and click-labeled site-specifically with an organic tetrazine dye conjugate. Organic dyes are very small with a size of only 0.5 – 2 nm and barely influence the natural function of proteins within the cell, which is beneficial for super-resolution microscopy. In this work, tetrameric postsynaptic NMDA receptors were bioorthogonally labeled via the *amber* suppression method for the first time. From a series of seven different *amber* mutants of the NR1 subunit, the Y392TAG mutant was the one with the best protein expression, labeling efficiency and receptor functionality, as shown by fluorescence microscopy and whole-cell patch clamp experiments. The bioorthogonal click staining by GCE was suitable for the NMDA receptor staining in different cell lines, with various tetrazine dye conjugates and for live-cell experiments. In *d*STORM measurements the tetrazine-Cy5 dye conjugate was ideal because of its size, photostability, brightness and appropriate blinking behavior. Accordingly, a homogenous NMDA receptor distribution on the cell membrane was observed. In contrast, NR1 antibody staining showed big cluster formation. The results show that small labels have a better accessibility to its target and are therefore much more suitable for super-resolution microscopy.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	v
Summary	vii
1 Einleitung	1
1.1 NMDA-Rezeptoren	3
1.1.1 Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis	5
1.2 Gephyrin	8
1.3 Fluoreszenzmikroskopie	9
1.3.1 Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie	13
1.4 Markierungsmethoden	19
1.4.1 Antikörper	20
1.4.2 Super-Binde-Peptide	22
1.4.3 Bioorthogonale Click-Färbung durch die Erweiterung des genetischen Codes	24
2 Material und Methoden.....	31
2.1 Molekularbiologie	31
2.1.1 Ortsspezifische Mutagenese mittels QuikChange PCR	31
2.1.2 Gelelektrophorese	33
2.1.3 Restriktionsendonukleasen-Verdau	34
2.1.4 Transformation und Bakterienkultur	34
2.1.5 Isolierung der Plasmid-DNA und Sequenzierung	35
2.2 Zellkultur	36
2.2.1 Transfektion und nicht-kanonische Aminosäuren	36
2.2.2 Primäre Kulturen von hippocampalen Neuronen	38
2.3 Histologie	38
2.3.1 Silanisierung von Deckgläsern	38
2.3.2 Kryostatschnitte von murinen Gehirngewebe	39
2.4 Gewebe- und Zellmarkierung	39
2.4.1 Immunfluoreszenzfärbung von primären Neuronen	39
2.4.2 Immunfluoreszenzfärbung von Gehirnschnitten	40
2.4.3 Super-Binde-Peptid-Färbung von Gephyrin	41
2.4.4 Bioorthogonale Click-Färbung	41
2.5 Elektrophysiologie	43

2.6	Mikroskopie.....	44
2.6.1	Konfokale Mikroskopie und FRAP-Experimente	44
2.6.2	Structured Illumination Microscopy (SIM).....	45
2.6.3	dSTORM.....	45
2.6.4	Bildrekonstruktion und -auswertung	47
3	Ergebnisse und Diskussion	51
3.1	Markierung des NMDA-Rezeptors durch Antikörperfärbung.....	51
3.1.1	Homer- und Bassoon-Färbung.....	52
3.1.2	NMDA-Rezeptor-Färbung in primären Neuronen	54
3.1.3	NMDA-Rezeptor-Färbung in Gehirnschnitten	60
3.2	Gephyrin-Färbung durch Super-Binde-Peptide.....	68
3.3	Bioorthogonale Click-Färbung des NMDA-Rezeptors durch GCE	73
3.3.1	Spezifität der bioorthogonalen Click-Markierung.....	73
3.3.2	Bioorthogonale Click-Markierung mit verschiedenen Farbstoffen.....	80
3.3.3	Lebendzell-Markierungen und Zellfunktionalität von bioorthogonal geklickten NMDA-Rezeptoren	83
3.3.4	Hochaufgelöste bioorthogonal geklickte NMDA-Rezeptoren	88
4	Fazit und Ausblick	91
	Abkürzungsverzeichnis.....	103
	Publikationen	107
	Literaturverzeichnis	109
	Danksagung	127

1 Einleitung

Schon seit sehr langer Zeit ist es ein Menschheitstraum kleine Dinge groß zu sehen. Somit war die Erfindung des Mikroskops revolutionär für die Biowissenschaften. Ende des 16. Jahrhunderts wurde das erste Mikroskop mit noch relativ geringer Vergrößerung in den Niederlanden von Hans und Zacharias Janssen gebaut. Schon Anfang des 17. Jahrhunderts konnte Antoni van Leeuwenhoek mit seinem Mikroskop mit 300-facher Vergrößerung Bakterien, Blut, Schimmelpilze und einzellige Lebewesen betrachten und somit einen wesentlichen Beitrag zu den Grundlagen der wissenschaftlichen Mikroskopie leisten (Mulisch et al. 2015). Erst im Jahre 1873 fand Ernst Abbe heraus, dass die Auflösung der Lichtmikroskopie durch die Beugung begrenzt ist und somit nicht besser sein kann als die halbe Wellenlänge des einfallenden Lichts. Dies bedeutet eine maximal erreichte laterale Auflösung von ~ 200 nm und axiale Auflösung von ~ 500 nm (Abbe 1873). Die Überwindung der Beugungsgrenze stellte die Wissenschaft lange Zeit vor Herausforderungen. Erst in den 1990-er und 2000-er Jahren wurde das Abbe-Limit erstmals durch drei neue Prinzipien der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie überwunden (Mulisch et al. 2015):

1. Hochauflösende Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie (engl. *single-molecule localization microscopy*, SMLM)
2. Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie mit Hilfe von strukturierter Beleuchtung (engl. *structured illumination microscopy*, SIM)
3. Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie mittels stimulierter Emissions-Depletions-Mikroskopie (engl. *stimulated emission depletion*, STED)

Dadurch wurden neue Möglichkeiten geschaffen und es konnten neue Targets mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Verfahren erforscht werden. Mit einer maximal erreichbaren Auflösung von bis zu 20 nm, die die Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie erlaubt, kann man nun die Organisation, Struktur und Funktion verschiedenster kleinster zellulärer Bestandteile der unterschiedlichsten Organe beobachten. Das Gehirn stellt dabei das Organsystem dar, dessen zelluläre Zusammenhänge noch am wenigsten verstanden sind. Grund dafür sind

zahlreiche Herausforderungen für diverse neurobiologische Bildgebungsverfahren, sowohl für die klassische Weitfeldmikroskopie als auch im hochauflösenden Bereich (Lichtman und Denk 2011). So herrscht im Gehirn eine vergleichsweise hohe zelluläre Diversität vor, in der die morphologisch unterschiedlichsten Nervenzellen existieren. Um zusammenhängende Funktionen bestimmter Zelltypen einzuteilen, werden diese oft durch die Verwendung von Antikörpern klassifiziert. Jedoch bleibt es nach wie vor sehr anspruchsvoll, in dickeres Gewebe mikroskopisch vorzudringen. Zusätzlich überwiegt eine derart hohe Dichte an sowohl synaptischer als auch extrasynaptischer Epitope innerhalb einer Nervenzelle, dass es oft zu unspezifischen Bindungen kommen kann. Synapsen dienen der Signalübertragung und der komplexen neuronalen Vernetzung an den Endigungen von Axonen und Dendriten einer Nervenzelle. Dabei werden Prä- und Postsynapse jeweils durch den synaptischen Spalt voneinander getrennt, der sich mit einer Größe von ~ 20 nm weit unterhalb der Auflösungsgrenze befindet. Lediglich durch Verwendung hochauflösender Fluoreszenzmikroskopietechniken ist es möglich prä- und postsynaptische Proteine voneinander zu unterscheiden und sichtbar zu machen (Dani et al. 2010). In dieser Arbeit wurden die zwei postsynaptischen Proteine NMDA-Rezeptor und Gephyrin untersucht, an denen drei verschiedene Markierungsmethoden für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie getestet wurden. Dabei wurde einerseits die Markierung des membranständigen NMDA-Rezeptors durch klassische Antikörperfärbung optimiert und mit Hilfe der hochauflösenden Mikroskopietechniken SIM und *d*STORM analysiert. Um die optische Auflösung nochmals verbessern zu können, wurden deutlich kleinere Markierungsmöglichkeiten erprobt. So wurde die Verwendung kleiner hochspezifischer sog. „Super-Binde-Peptide“ für das intrazelluläre postsynaptische Ankerprotein Gephyrin untersucht und mit kommerzieller Antikörperfärbung verglichen. Darüber hinaus wurde erstmals die Methode der bioorthogonalen Click-Färbung durch die Erweiterung des eukaryotischen genetischen Codes für die Markierung des NMDA-Rezeptors eingeführt, um kleine organische Farbstoffe nutzen zu können.

1.1 NMDA-Rezeptoren

N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDAR) befinden sich auf der postsynaptischen Membran von Neuronen und gehören zusammen mit den AMPA- (engl. *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*) und Kainat-Rezeptoren zu den ionotropen Glutamatrezeptoren. Sie sind vor allem im Hippocampus des Gehirns lokalisiert und haben wichtige Funktionen in der synaptischen Plastizität und bei Lern- und Gedächtnisprozessen im zentralen Nervensystem (Dingledine et al. 1999). Der Name des Rezeptors beruht auf Laborexperimenten, bei denen die Bindung des, normalerweise nicht im Körper vorkommenden, Agonisten N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) zur Aktivierung des Rezeptors führte (Watkins und Jane 2006). Der NMDA-Rezeptor selbst ist ein Heterotetramer, der aus zwei obligatorischen Glycin-bindenden NR1-Untereinheiten (auch GluN1 genannt) und zwei L-Glutamat-bindenden NR2-Untereinheiten (auch GluN2 genannt) besteht. Erst im späten 20. Jahrhundert wurde die dritte Glycin-bindende NR3-Untereinheit (auch GluN3 genannt) entdeckt (Low und Wee 2010). NR1 wird durch ein einziges Gen codiert, wobei die NR1-mRNA acht verschiedene Splicevarianten aufweist. Die NR2-Untereinheit dagegen besitzt vier verschiedene Isoformen, die jeweils von unterschiedlichen Genen codiert werden: NR2A, NR2B, NR2C und NR2D (Flores-Soto et al. 2012). NR3 wird durch die zwei Gene NR3A und NR3B codiert (Ciabarra et al. 1995; Nishi et al. 2001). All diese Untereinheiten teilen sich eine gemeinsame Membranstruktur, bei der die aminoterminal Domäne (ATD) zur Kontrolle der Kanalöffnung und Deaktivierungsgeschwindigkeit beiträgt, die Ligand-Binde-Domäne (LBD) für die Bindung von Agonisten und Antagonisten zuständig ist, die transmembrane Domäne (TMD) den heterotetrameren Ionenkanal bildet und die carboxyterminale Domäne (CTD) mit intrazellulären Proteinen in der Postsynapse interagiert (Karakas und Furukawa 2014; Furukawa et al. 2005) (Abbildung 1.1 A). Die Aktivierung des Rezeptors ist sowohl spannungs- also auch Liganden-abhängig. Es muss eine AMPA-Rezeptor-vermittelte Depolarisation der postsynaptischen Membran stattfinden, wodurch der spannungsabhängige Magnesiumblock innerhalb der Kanalpore entfernt wird (Abbildung 1.1 B). Außerdem muss eine gleichzeitige Bindung von Glycin- bzw. D-Serin an die NR1-Untereinheit und L-Glutamat an die NR2-Untereinheit erfolgen. Glutamat wird hierbei als Neurotransmitter aktivitätsabhängig von der Präsynapse freigegeben. Glycin dagegen agiert als Modulator, der in der extrazellulären Flüssigkeit im synaptischen Spalt vorliegt. Durch die Öffnung des Kanals kann intrazelluläres Kalium aus der Zelle austreten und extrazelluläres Natrium oder Kalzium einströmen, wodurch weitere intrazelluläre enzymatische Signalkaskaden angekurbelt werden (Flores-Soto et

al. 2012). Fehlfunktionen des Rezeptors können diverse neurodegenerativen Erkrankungen auslösen. So führt z.B. eine chronische Glutamat-Überstimulierung zu erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentrationen, was eine sog. Exzitotoxizität, eine Apoptose von Nervenzellen, hervorrufen kann. Dies kann eine verstärkte Immunantwort und Schädigung größerer Hirnareale verursachen, was u.a. zu Epilepsien, Hypoxie und Traumata führt (Dong et al. 2009). Durch die Blockierung des Rezeptors können weitere Erkrankungen entstehen, wie beispielsweise die Autoimmunkrankheit Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis, bei der körpereigene Autoantikörper den Rezeptor binden.

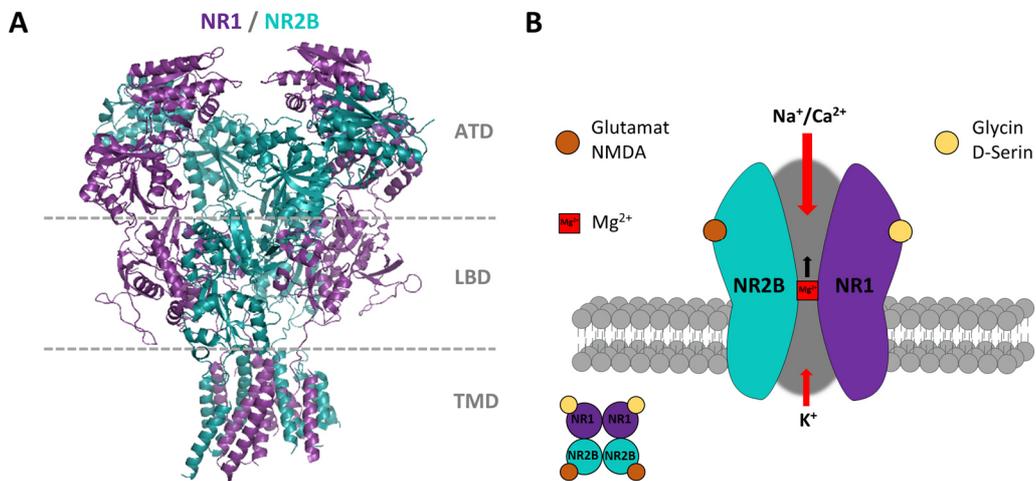


Abbildung 1.1: Struktur und Funktion des NMDA-Rezeptors. (A) Kristallstruktur des NMDA-Rezeptors mit zwei NR1- und zwei NR2B-Untereinheiten (violett und cyan) und den markierten Domänen: aminoternale Domäne (ATD), Ligand-Binde-Domäne (LBD) und transmembrane Domäne (TMD) (Protein-Datenbank PDB: 4PE5). (B) Die Aktivierung des NMDA-Rezeptors erfolgt durch Depolarisierung der postsynaptischen Membran, wodurch der Magnesiumblock (Mg²⁺) innerhalb der Pore entfernt wird. Gleichzeitig muss die Bindung der Agonisten Glutamat bzw. NMDA an die NR2-Untereinheit und Glycin bzw. D-Serin an die NR1-Untereinheit erfolgen. Dadurch kann Natrium (Na⁺) und Kalzium (Ca²⁺) in die Zelle einströmen und Kalium (K⁺) austreten.

1.1.1 Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis

Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis ist eine seltene Autoimmunerkrankung im Gehirn, die erstmals im Jahre 2007 von Josep Dalmau et al. beschrieben wurde (Dalmau et al. 2007). Hierbei produzieren Patienten sog. Autoantikörper, die an die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors binden, wodurch ein schneller und reversibler Verlust der NMDA-Rezeptoren auf der Postsynapse induziert wird. Der verringerten Rezeptoranzahl liegt einer IgG-Autoantikörper-vermittelten Internalisierung zugrunde, was dazu führt, dass wichtige Informationen nicht mehr ausreichend weitergegeben werden können (Dalmau et al. 2008). Da die Dichte der NMDA-Rezeptoren im Hippocampus sehr hoch ist, treten besonders dort Störungen auf. So leiden beispielsweise viele Betroffene unter Amnesie (Gedächtnisverlust) oder starken emotionalen Schwankungen. Überwiegend junge Frauen erkranken an Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis (80 % der Erkrankten sind Frauen mit einem Durchschnittsalter von 22 Jahren), wobei es oft durch eine Herpes-simplex-Enzephalitis oder einen Tumor, in den meisten Fällen einem Eierstock-Teratom, ausgelöst wird (Dalmau et al. 2019). Teratome sind angeborene Keimzelltumore und können u.a. Nervengewebe enthalten. Dies könnte vom Immunsystem als körperfremd eingestuft werden und eine Immunreaktion hervorrufen, die sich auf das Gehirn ausweitet. Wie dabei die Blut-Hirn-Schranke überwunden werden kann, ist allerdings noch weitestgehend unbekannt. Eine operative Entfernung des Teratoms führt in vielen Fällen zu einer Heilung der Krankheit (Titulaer et al. 2013). Der Krankheitsverlauf beginnt anfangs häufig mit grippeähnlichen Symptomen, die in den nächsten Wochen zu psychiatrischen Symptomen wie Agitation, Halluzinationen, Wahn, Psychosen, Gedächtnisverlust, Sprachstörungen und Schlaflosigkeit führen. In dieser Phase werden viele Patienten in Psychiatrien überwiesen, in denen sie mit Psychopharmaka behandelt werden, die die Ursache der Krankheit allerdings nicht bekämpfen. Die dritte Phase der Erkrankung geht mit Störungen der Motorik wie Dyskinesie, Herzrhythmusstörungen, Hyperventilation und Bewusstlosigkeit einher, was im schlimmsten Fall zum Tod der Patienten führen kann (in 4 % der Fälle) (Florance et al. 2009; Dalmau et al. 2008). Diagnostiziert wird die Krankheit durch den Nachweis NMDA-Rezeptor-spezifischer Autoantikörper im Serum oder Liquor. Übliche Untersuchungen wie Bluttests, MRT oder CT liefern oft keine eindeutigen Befunde. Die Behandlung erfolgt durch Zugabe von Immunsuppressiva, Plasmaaustausch und ggf. die Entfernung eines vorhandenen Tumors. Wird die Krankheit frühzeitig erkannt und behandelt, kann eine vollständige Genesung erfolgen (Dalmau et al. 2011; Dalmau et al. 2019). Die genaue Ursache der Autoantikörper-Bildung bleibt weitestgehend ungewiss. Allerdings konnte das genaue

Epitop der Autoantikörper auf der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors nachgewiesen werden. Gleichman et al. konnten zeigen, dass Autoantikörper von Patienten mit Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis die Region N368/G369 auf der aminoterminalen Domäne der NR1-Untereinheit binden (Gleichman et al. 2012). Die Effekte der IgG-Autoantikörper konnten ebenso im Tiermodell gezeigt werden, indem Mäusen mittels osmotischer Kathederpumpen kontinuierlich Patientenliquor zugeführt wurde und sie schließlich auffällige Verhaltensmuster aufwiesen, wie Gedächtnisstörungen, depressives Verhalten, Angst, Aggressivität und Bewegungsstörungen. Nachfolgende Gehirngewebeanalysen zeigten eine erhöhte Anzahl an NR1 gebundenen humanen IgG-Antikörpern, vor allem im Hippocampus. Außerdem wurde eine verringerte Dichte synaptischer NMDA-Rezeptoren festgestellt, ohne dass AMPA-Rezeptoren oder PSD-95 (engl. *postsynaptic density protein 95*) beeinflusst wurden (Planagumà et al. 2015). Mikasova et al. fanden 2012 heraus, dass durch Autoantikörper von Patienten mit Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis die Interaktion zwischen Ephrin-Rezeptoren (EphB2R) und NMDA-Rezeptoren gestört wird (Abbildung 1.2). EphB2-Rezeptoren sind Rezeptortyrosinkinasen auf der Postsynapse, die durch den Liganden Ephrin B2 aktiviert werden und dadurch den NMDA-Rezeptor rekrutieren, indem sie an der extrazellulären Domäne der NR1-Untereinheit binden (Dalva et al. 2000). Diese Interaktion spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung der synaptischen Funktion und dem Transport von NMDA-Rezeptoren. Durch Autoantikörper-Bindung wird diese Interaktion gestört, was dazu führt, dass NMDA-Rezeptoren in den extrasynaptischen Bereich transportiert und von dort aus internalisiert werden (Mikasova et al. 2012; Planaguma et al. 2016). So konnte an Mäusen eine Abnahme von NMDA- und EphB2-Rezeptoren festgestellt werden, nachdem sie mit Patientenliquor behandelt wurden. Durch Zugabe des Liganden Ephrin B2 konnten die pathogenen Effekte der Autoantikörper verhindert werden. Die Mäuse zeigten in diesem Fall keine Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis spezifischen Verhaltensmuster wie Gedächtnisstörung, Depression, usw. sowie keinerlei Internalisierung von NMDA- und EphB2-Rezeptoren (Planaguma et al. 2016). Somit könnte der Ligand Ephrin B2 für eine neue mögliche Behandlungsmethode der Krankheit eingesetzt werden. Seit der erstmaligen Entdeckung der Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis im Jahre 2005 (Ances et al. 2005; Vitaliani et al. 2005) konnten bereits einige Ursachen der Krankheit herausgefunden werden. Jedoch bleiben weiterhin viele Fragen offen. So ist z.B. nach wie vor unklar, wie genau die Autoantikörper die NMDA-Rezeptoren auf der Postsynapse beeinflussen und sie zur Internalisierung bringen. In dieser Arbeit wurde die Bindung verschiedener pathogener Autoantikörper, die von Patienten mit Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis isoliert und aufgereinigt wurden, analysiert. Dabei sollte sowohl in

Neuronen als auch in Gehirnschnitten herausgefunden werden, ob Patientenantikörper die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors spezifischer binden als kommerziell erhältliche NR1-Antikörper.

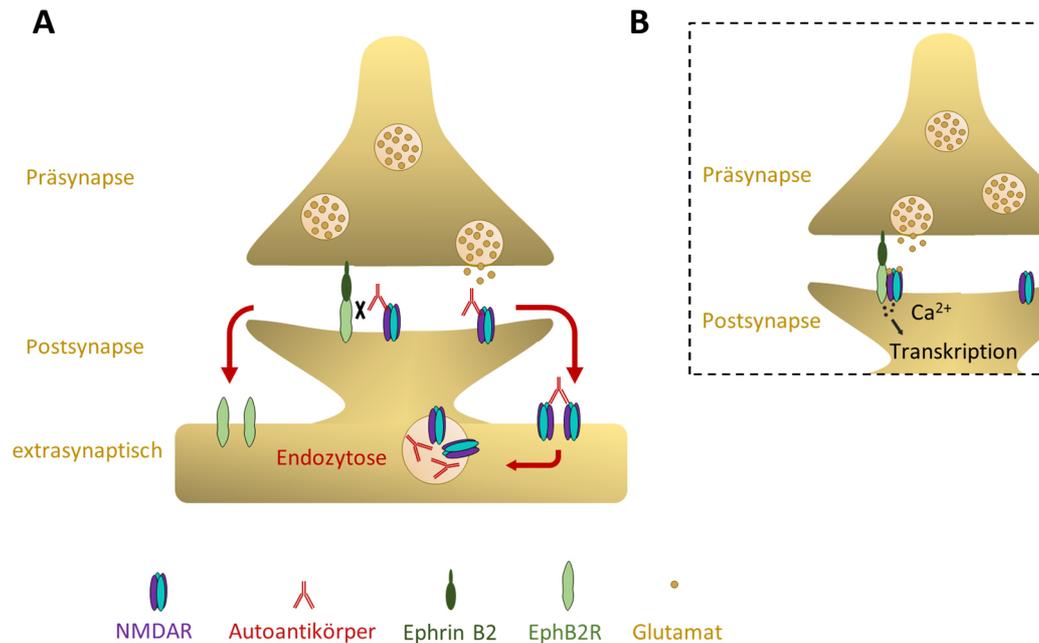


Abbildung 1.2: Hypothetisches Model zum Autoantikörper-vermittelten pathogenen Einfluss auf NMDA-Rezeptoren bei Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis Erkrankungen. (A) Die Bindung des IgG-Autoantikörpers von Patienten mit Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis an die NR1-Untereinheit (violett) des NMDA-Rezeptors beeinflusst die normale Interaktion des NMDA-Rezeptors mit Ephrin-Rezeptoren (EphB2R). Dadurch wandern NMDA-Rezeptoren in den extrasynaptischen Bereich und werden internalisiert (Dalmau et al. 2017). (B) Normalerweise, wenn keine Erkrankung vorliegt und somit keine Autoantikörper gebildet wurden, wird EphB2R durch seinen Liganden Ephrin B2 aktiviert, was zur NR1-Bindung des NMDA-Rezeptors führt.

1.2 Gephyrin

Die postsynaptischen Chloridkanäle γ -aminobutyric acid type A-Rezeptoren (GABA_AR) und Glycin-Rezeptoren (GlyR) werden durch die Neurotransmitter GABA (engl. *γ-aminobutyric acid*) und Glycin aktiviert und bewirken somit eine schnelle synaptische Inhibierung. Beide inhibitorischen (hemmenden) Rezeptoren werden durch das Ankerprotein Gephyrin mit dem Cytoskelett der Zelle verankert und geclustert. Somit bestimmt Gephyrin die akkurate Lokalisation und stabilisiert GABA_A- und Glycin-Rezeptoren in der Postsynapse, indem sie mit der Cytoskelettkomponenten Actin verbunden werden (Tyagarajan und Fritschy 2014; Kim et al. 2006). Im Allgemeinen sind Ankerproteine für die Organisation, Struktur, Funktion und Plastizität von Synapsen zuständig und ermöglichen eine schnelle, strukturelle und funktionale Adaption an Veränderungen in der Netzwerkaktivität. So stellt die analoge Komponente zu Gephyrin das Ankerprotein PSD-95 dar, das u.a. für die Organisation von NMDA-Rezeptoren auf excitatorischen (erregenden) Synapsen zuständig ist. Die exakte Funktion von Gephyrin in GABAergen und glycinergen Synapsen ist weitestgehend unbekannt. Wahrscheinlich weist Gephyrin eine höhere Interaktionsaffinität zu Glycin-Rezeptoren als zu GABA_A-Rezeptoren auf. Möglicherweise interagieren nur diejenigen GABA_A-Rezeptoren mit Gephyrin, die eine α 1-, α 2- oder α 3-Untereinheit besitzen (Maric et al. 2011; Tyagarajan und Fritschy 2014). Welche Rolle Gephyrin jedoch genau beim Clustern von GABA_A-Rezeptoren spielt, ist noch ungeklärt. Mittlerweile konnten einige Bindungspartner von Gephyrin identifiziert werden, so z.B. Neuroglin-2 und Collybistin, die hauptsächlich für das Gephyrin-Clustern zuständig sind. Dynein, GABARAP (engl. *GABA_A receptor-associated protein*), CDC42 (engl. *cell division control protein 42*), Profilin und Rapamycin ermöglichen wahrscheinlich die Bindung des Cytoskeletts und weiterer Motorproteine (Tyagarajan und Fritschy 2014; Fritschy et al. 2008; Kim et al. 2006). Somit könnte Gephyrin noch weitere bisher unbekannt Funktionen in Neuronen besitzen, indem es mit weiteren Proteinen interagiert. Ferner ist die Struktur von Gephyrin noch nicht komplett erforscht. Man weiß, dass Gephyrin aus drei Domänen besteht: der G-, C- und E-Domäne. Es ist bekannt, dass die carboxyterminale E-Domäne den β -Loop der GlyR β -Untereinheit bindet und somit das Rezeptor-Clustern reguliert (Kim et al. 2006; Lardi-Studler et al. 2007). Die C-Domäne ist ein Linker zwischen beiden Domänen und interagiert mit anderen synaptischen Proteinen wie GABARAP und Dynein. Man glaubt, die C-Domäne sei besonders wichtig für die Funktion von Gephyrin (Fritschy et al. 2008). Die aminoterminal E-Domäne ist wahrscheinlich zusammen mit der E-Domäne in

der Molybdän-Cofaktor-Biosynthese beteiligt (Sola et al. 2001). Einige neurologische Erkrankungen werden auf eine Gephyrin-Dysfunktion zurückgeführt, so z.B. Stiff-Person-Syndrom, Epilepsie, Hyperreflexie, Autismus und Schizophrenie (Butler et al. 2000; Fang et al. 2011; Rees et al. 2003; Lionel et al. 2013). Diese Erkrankungen sind teilweise auf Defekte im glycinergen System zurückzuführen. Gephyrin ist außerdem wichtiger Bestandteil der Molybdän-Cofaktor-Biosynthese in nichtneuronalem Gewebe. Vererbte Mutationen im Gephyrin-Gen können zur Molybdän-Cofaktor-Defizienz führen, wodurch schwer therapierbare Krämpfe nach der Geburt entstehen können (Reiss und Johnson 2003). *In vivo* Versuche zeigten, dass Gephyrin knock-out Mäuse einige Stunden nach der Geburt sterben (Feng et al. 1998). Möglicherweise sind diese Mäuse aufgrund des nachgewiesenen Verlustes an GlyR-Cluster (Feng et al. 1998) und einiger GABA_AR-Cluster (Kneussel et al. 1999) nicht lebensfähig. Um die Funktion von Gephyrin genauer verstehen zu können, ist weitere Grundlagenforschung notwendig. Dabei spielt die Visualisierung des Proteins innerhalb der Postsynapse eine wichtige Rolle, um Lokalisierungen und mögliche Interaktionen mit anderen Proteinen sichtbar zu machen. In dieser Arbeit wurde Gephyrin mit Hilfe einer neuen Markierungsmethode untersucht, bei der sich die Verwendung von sehr kleinen hochspezifisch bindenden Peptiden, sog. „Super-Binde-Peptide“, vorteilhaft für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie herausstellte.

1.3 Fluoreszenzmikroskopie

Seit den letzten 20 Jahren hat die Fluoreszenzmikroskopie in der Biowissenschaft und Medizin an immer größerer Bedeutung gewonnen. Sie ermöglicht die direkte Beobachtung zellulärer Strukturen und Prozesse aufgrund eines hohen Kontrasts von Signal und Hintergrund. Die Entdeckung der Fluoreszenz geht auf George Gabriel Stokes im Jahre 1852 zurück (Stokes 1852). Bei der Untersuchung von Chinin erkannte er, dass bestimmte Moleküle – sog. Fluorophore – leuchten, wenn sie mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden. Dabei wird die aufgenommene Lichtenergie als Absorption bezeichnet. Das abgesendete Licht des Fluorophors hat dagegen eine größere Wellenlänge, auch Emission genannt. Dieses Phänomen der Verschiebung hin zur längeren Wellenlänge (Verschiebung in den roten Bereich) wird als „Stokes‘ Shift“ bezeichnet, d.h. die Energie der Emission ist typischerweise geringer als die des absorbierten Lichtes (Abbildung 1.3 A). Die genaue physikalische Erklärung der Fluoreszenz wurde erst später im

Jahre 1935 von Alexander Jablonski beschrieben (Abbildung 1.3 B). Fluorophore besitzen Elektronen, die durch Absorption von Licht einer geeigneten Wellenlänge aus ihrem Grundzustand (Singulett-Zustand S_0) in energetisch höhere Zustände angeregt werden (Singulett-Zustand S_1 oder S_2). Dort verweilen sie kurz und verlieren durch Schwingungsrelaxationen (R) innerhalb ihres elektronischen Zustandsniveaus oder durch innere Umwandlung (engl. *Internal Conversion*, IC) einen Teil ihrer für die Anregung notwendigen Energie. Schließlich kehren sie in den Grundzustand S_0 zurück, indem sie die freiwerdende Energie als längerwelliges Emissionslicht (Fluoreszenz) abgeben. Moleküle des angeregten S_1 -Zustandes können in selteneren Fällen auch durch Interkombinationsübergänge (engl. *Intersystem Crossing*, ISC) strahlungslos in den energetisch niedrigeren Triplett-Zustand (T_1) überwechseln und von dort aus durch Phosphoreszenz zurück in den Grundzustand S_0 kehren. Phosphoreszenz ist typischerweise ein langlebiger Zustand und somit im Gegensatz zur Fluoreszenz zu noch energieärmerem längerwelligerem Licht verschoben (Lakowicz 2006; Mulisch et al. 2015). Bei der Fluoreszenzmikroskopie macht man sich das Prinzip des Stokes' Shift zunutze, indem die zu detektierende Fluoreszenz der Probe durch optische Bauteile vom Anregungslicht getrennt wird. Jedoch unterliegt sowohl die herkömmliche Lichtmikroskopie als auch die Fluoreszenzmikroskopie aufgrund der natürlichen Eigenschaften des Lichts der von Ernst Abbe und Lord Rayleigh beschriebenen Auflösungsgrenze (Abbe 1873; Rayleigh 1903). Abbe deklarierte, dass die Auflösung eines Lichtmikroskops durch etwa die halbe Wellenlänge des einfallenden Lichts begrenzt ist (Abbe 1873):

$$d = \frac{\lambda}{2n * \sin(\alpha)} = \frac{\lambda}{2NA} \quad (1.1)$$

Hierbei beschreibt die Auflösung d den Abstand zweier Punkte, die noch als getrennt wahrgenommen werden können. Sie ist abhängig von der Wellenlänge des einfallenden Lichts (λ), dem Brechungsindex des verwendeten Mediums (n) und dem Öffnungswinkel des Objektivs (α), wobei hier die zwei letzteren als numerische Apertur des Objektivs (NA) zusammengefasst werden können. Aufgrund der begrenzten Fähigkeiten eines optischen Systems und der dadurch auftretenden Beugung von Licht, wird ein emittierter Fluorophor nur als „Punktähnlich“ abgebildet. Er erscheint als runder gebeugter Punkt mit einem zentralen Hauptmaximum (direktes ungebeugtes Licht), gefolgt von umringenden Nebenmaxima mit deutlich geringerer Intensität (gebeugtes Licht), was als Punktspreizfunktion (PSF) bezeichnet wird. Das Profil einer lateralen PSF erscheint oft als Form eines Beugungsscheibchens (engl. *Airy disc*) (Abbildung 1.3 C). Laut Lord Rayleigh sind zwei nebeneinander liegende Punkte gerade noch auflösbar, wenn

das Intensitätsmaximum der ersten PSF in das erste Intensitätsminimum der zweiten PSF fällt (Rayleigh Kriterium). Der minimalste Abstand zweier Punkte kann somit durch folgende Formel beschrieben werden (Rayleigh 1903):

$$d = \frac{1,22 * \lambda}{2NA} \quad (1.2)$$

Exemplarisch können also Fluorophore mit einem Emissionsmaximum von 670 nm, die mit einem Objektiv mit einer NA von 1,40 betrachtet werden, eine laterale Auflösung von ~ 290 nm aufweisen.

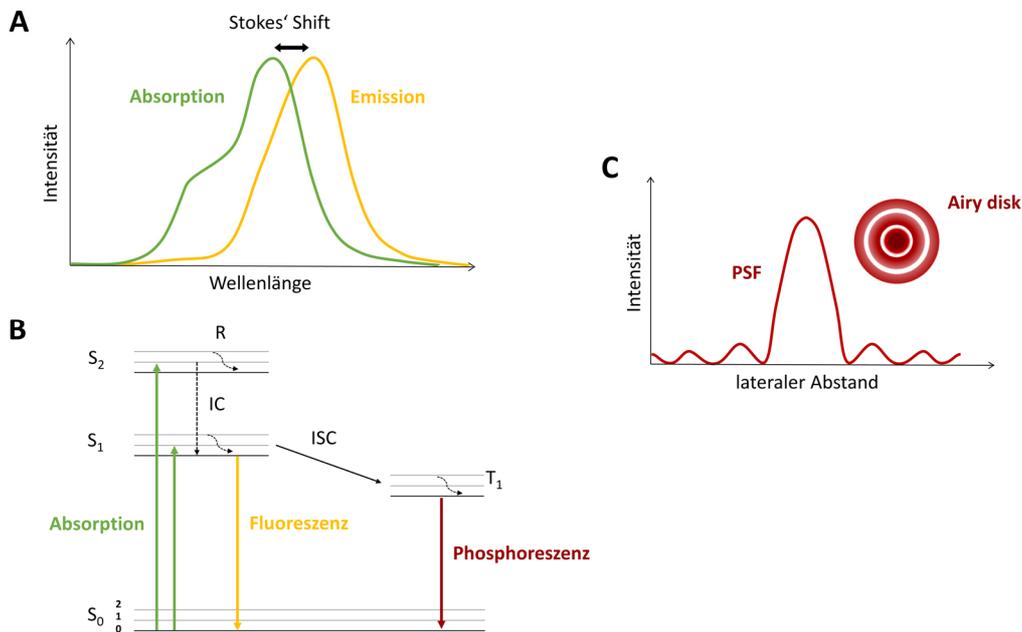


Abbildung 1.3: Fluoreszenz. (A) Als Stokes' Shift wird die Verschiebung der Wellenlängen zwischen Absorption und Emission bezeichnet. Die Energie der Emission ist dabei geringer als die des absorbierten Lichts. (B) Das Jablonski-Diagramm veranschaulicht die Phänomene der Fluoreszenz und Phosphoreszenz. Durch Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge werden Elektronen aus ihrem Grundzustand (Singulett-Zustand S_0) in die Singulett-Zustände S_1 oder S_2 angeregt. Dort verlieren sie Energie durch Schwingungsrelaxationen (R) oder innerer Umwandlung (IC) und kehren in S_0 zurück, indem sie Fluoreszenz abgeben. Elektronen von S_1 können durch Interkombinationsübergänge (ISC) ebenfalls in den Triplett-Zustand (T_1) überwechseln und schließlich in S_0 zurückkehren, in dem sie Phosphoreszenz abgeben. (C) Aufgrund von Beugung werden emittierte Fluorophore innerhalb optischer Systeme als Beugungsscheibchen (engl. *Airy disk*) bzw. als Punktspreads-Funktion (PSF) abgebildet, die ein zentrales Hauptmaximum haben, gefolgt von umringenden Nebenmaxima.

Grundsätzlich unterscheidet die Fluoreszenzmikroskopie zwischen Weitfeld- und konfokaler Mikroskopie. Bei der klassischen Weitfeldmikroskopie wird ein homogener paralleler Lichtstrahl auf die Probe fokussiert, wodurch ein großer Bereich beleuchtet wird. Diese Art von Ausleuchtung wird auch EPI-Fluoreszenz genannt (Abbildung 1.4). Ein großer Nachteil der EPI-Fluoreszenz ist die großflächige Beleuchtung der Probe, sodass nicht nur die Fokusebene angeregt wird, sondern ebenfalls die darüber- und darunterliegenden Bereiche. Besonders bei dickeren Präparaten wird dadurch das eigentlich scharfe Bild im Fokus durch unscharfe Bildebenen außerhalb des Fokus überlagert, was die Bildqualität vermindert. Durch den Einbau zusätzlicher Spiegel in das Fluoreszenzmikroskop kann die Ausleuchtung so abgelenkt werden, dass weniger Fluorophore in der Z-Ebene angeregt werden, was zu einem geringeren Hintergrundrauschen führt. Bei dieser sog. Totalreflexionsmikroskopie (engl. *total internal reflection fluorescence microscopy*, TIRF) wird der Laserstrahl in einem flachen Winkel (sog. kritischer Winkel) an der Grenzfläche zwischen Glas und Probe total reflektiert (Abbildung 1.4). Dabei werden hauptsächlich diejenigen Fluorophore angeregt, die etwa 100 nm von der Glasoberfläche entfernt liegen (Axelrod 2001). Diese Methode ist besonders gut geeignet, um Membranproteine an der Deckglaszugewandten Seite zu messen. Um Strukturen innerhalb der Zelle zu messen, kann eine Beleuchtungsmethode mit geneigtem Lichtband verwendet werden, sog. HILO (engl. *highly inclined and laminated optical sheet*) (Abbildung 1.4). Hierbei wird der Lichtstrahl leicht unterhalb des kritischen Winkels verschoben, auf die Grenzfläche fokussiert und erzeugt dabei ein dünnes Lichtband, was die Probe durchstrahlt. Umso geringer die Dicke des Lichtbandes ist, desto besser ist das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (Tokunaga et al. 2008).

Durch die Verwendung konfokaler Fluoreszenzmikroskope wird störendes Hintergrundsignal reduziert, indem fokussierte Beleuchtung und der Einsatz einer Lochblende (engl. *pinhole*) zur Kontrastverbesserung führen (Mulisch et al. 2015). Im Gegensatz zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie werden bei der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie nur sehr kleine Bereiche der Probe beleuchtet, Stück für Stück abgerastert und schließlich zu einem Bild rekonstruiert. Dabei lässt die Lochblende ausschließlich Fluoreszenzlicht aus der Schärfenebene des Präparats durch, wobei das Licht aus anderen Ebenen (Hintergrundsignal) blockiert wird. Dadurch gelangen nur kleine Lichtpunkte durch den Detektor des Mikroskops, was zur Kontrastverstärkung führt. Besonders verbreitet sind konfokale Laser-Scanning-Mikroskope (CLSM), die die Probe durch einen fokussierten Laserstrahl punktförmig beleuchten und abrastern. Linienscanner dagegen zeichnen sich durch eine höhere Rastergeschwindigkeit aus, da sie die Probe linienförmig abrastern können. Ein kreisförmiges Abrastern des Präparats

geschieht mittels Nipkow-Scheibe, auf der mehrere Lochblenden spiralförmig angeordnet sind. In dieser Arbeit wurde die Konfokalmikroskopie aufgrund ihrer einfachen Handhabung und schnellen Bildgebung oft genutzt, um verschiedene Färbemethoden zu optimieren.

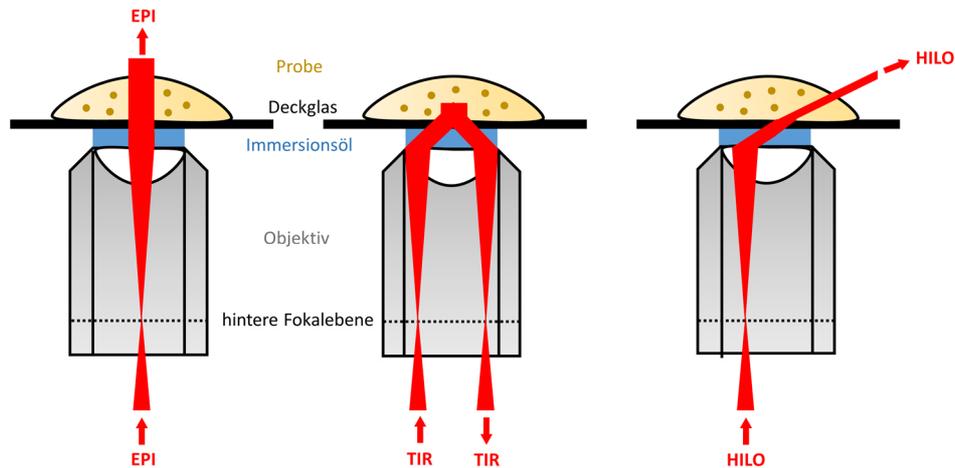


Abbildung 1.4: Unterschiedliche Probenbeleuchtungsarten bei der Weitfeldmikroskopie. Die EPI-Ausleuchtung (links) fokussiert das Laserlicht auf die hintere Fokalebene und bestrahlt die Probe parallel, sodass diese großflächig beleuchtet wird. Im Falle von TIR (Totalreflexion) wird der Strahl an die äußersten Ecken des Objektivs auf der hinteren Fokalebene fokussiert und in einem flachen Winkel (sog. kritischer Winkel) an der Grenzfläche zwischen Glas und Probe reflektiert, sodass nur Fluorophore nahe der Glasoberfläche angeregt werden (Mitte). Im HILO-Modus wird der Lichtstrahl leicht unterhalb des kritischen Winkels verschoben, wodurch die Probe mit einem dünnen Lichtband bestrahlt wird (rechts).

1.3.1 Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie

Lange Zeit waren Wissenschaftler auf die Elektronenmikroskopie angewiesen, um Strukturen unterhalb des Abbe-Limits auflösen zu können. Die damit einhergehenden Nachteile waren vor allem eine sehr aufwendige und Artefakt-induzierende Probenpräparation von fixiertem Material, u.a. durch die Zugabe kontrasterhöhender Schwermetalle. Außerdem konnten lediglich schwarz-weiße Bildaufnahmen erzeugt werden, da Elektronen keinerlei Farbinformation transportieren können. Jedoch bestand weiterhin der Wunsch, kleinere zelluläre Strukturen farbig zu markieren und sogar im lebenden Zustand zu betrachten.

Erst seit Anfang der 1990-er Jahre wurden verschiedene fluoreszenzmikroskopische Techniken eingeführt, die es ermöglichten, Strukturen unterhalb des Abbe-Limits, also unterhalb von 200 nm, aufzulösen (Mulisch et al. 2015). Diese hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie-Methoden lassen sich in zwei verschiedene Kategorien einteilen:

1. Super-Resolution-Mikroskopie, basierend auf definierter strukturierter Beleuchtungsmuster, z.B. SIM (engl. *structured illumination microscopy*) und STED (engl. *stimulated emission depletion*)
2. Super-Resolution-Mikroskopie, basierend auf Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie, bei der individuelle Fluorophore stochastisch und zeitlich voneinander getrennt aktiviert und anschließend mathematisch rekonstruiert werden, z.B. PALM (engl. *photoactivated localization microscopy*) und dSTORM (engl. *direct stochastic optical reconstruction microscopy*)

SIM (engl. *structured illumination microscopy*) zählt zu den hochauflösenden Mikroskopiemethoden, die zu Beginn der 2000-er Jahre entwickelt wurden (Gustafsson 2000; Heintzmann und Cremer 1999). Bei dieser Art von Weitfeldmikroskopie wird die Probe mit einem sehr feinen sinusförmigen Streifenmuster angeregt, was in die Fokusebene projiziert wird. Das Streifenmuster wird durch ein Gitter erzeugt und während der Bildaufnahme in mindestens drei verschiedene Positionen verschoben und um drei verschiedene Orientierungen rotiert. Somit werden pro Aufnahme mindestens neun Bilder von unterschiedlichen Positionen des Gitters aufgenommen. Mit Hilfe eines hochempfindlichen Kamerasystems (engl. *scientific complementary metal-oxide-semiconductor*, sCMOS oder engl. *electron multiplying charge-coupled device*, EMCCD) wird die Überlagerung der unbekannt Probe und des bekannten Gittermusters detektiert. Am Gittermuster treten Interferenzerscheinungen auf, sog. Moiré-Muster, die bei der Überlagerung zweier Strukturen entstehen. Im Gegensatz zur kommerziellen Fluoreszenzmikroskopie können mit Hilfe des Moiré-Musters kleinere Strukturen jenseits der Auflösungsgrenze detektiert und somit eine laterale und axiale Auflösungsverbesserung um den Faktor 2 erzielt werden. Dementsprechend ist eine laterale Auflösung von ~ 90 nm und eine axiale Auflösung von ~ 250 nm möglich. Um 3D-SIM Aufnahmen zu generieren, muss die Gitterstruktur zusätzlich in die dritte Dimension verschoben werden, wodurch insgesamt mindestens 15 Bilder aufgenommen werden müssen (Schermelleh et al. 2008). Dies hat den Nachteil der Fluoreszenzbleichung, weshalb man für SIM besonders photostabile Farbstoffe auswählt. Da SIM-Aufnahmen mit sehr hohen

Geschwindigkeiten generiert werden können, ist dies ebenfalls eine gute Methode, um dynamische Prozesse in lebenden Zellen zu analysieren (Mulisch et al. 2015). In dieser Arbeit wurde SIM als eine der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie-Methoden eingesetzt, um das postsynaptische Protein Gephyrin und den NMDA-Rezeptor sichtbar zu machen.

STED (engl. *stimulated emission depletion*) wurde 1994 von Stefan Hell beschrieben (Hell und Wichmann 1994), der dafür im Jahre 2014 zusammen mit Eric Betzig und William Moerner den Nobelpreis für Chemie erhielt. STED ist eine Konfokalmikroskopie-basierende Methode, bei der die Probe Punkt für Punkt abgerastert wird. Hierbei wird neben dem Anregungslaser noch ein zweiter rot-verschobener Donut-förmiger Laserstrahl eingesetzt (sog. STED-Laser), um stimulierte Emission der Fluorophore außerhalb des Fokus zu erzeugen. Somit werden Fluorophore im Zentrum, das kleiner als die Auflösungsgrenze ist, emittiert und detektiert. Äußere Photonen werden dagegen vom STED-Laser gezielt ausgeschaltet, indem sie vom Singulettzustand S_1 in den Grundzustand S_0 überwechseln. Durch Verwendung von Wellenlängen-spezifischer optischer Filter, wird das rot-verschobene Signal der stimulierten Emission blockiert, sodass nur Photonen aus dem Zentrum detektiert werden. Die Auflösung von STED ist von der Intensität des STED-Lasers abhängig, da die Größe des Zentrums abnimmt, je höher die Laserintensität ist. Bisher konnten maximale laterale Auflösungen von 20 – 100 nm erzielt werden (Hell 2007).

Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie (engl. *single-molecule localization microscopy*, **SMLM**) ist eine Weitfeldmikroskopiemethode und kann eine zehnfache Auflösungsverbesserung gegenüber konventioneller Fluoreszenzmikroskopie erreichen, d.h. eine Auflösung von bis zu 20 nm. Hierbei wird die Position des Fluoreszenzsignals von einzelnen Farbstoffmolekülen mit Hilfe hochsensitiver EMCCD-Kameras genau bestimmt. Das Fluoreszenzsignal von einem Farbstoffmolekül lässt sich als Punktspreizfunktion (PSF) abbilden, die an eine Gaußfunktion angepasst wird. Die Genauigkeit der Lokalisationsbestimmung (I) hängt von der Anzahl der detektierten Photonen (N), der Standardabweichung der Gaußfunktion (σ) und von Hintergrundsignalen ab. Für sehr helle Fluorophore kann das Hintergrundsignal jedoch vernachlässigt werden, woraus folgende Lokalisationsgenauigkeit resultiert (Thompson et al. 2002):

$$I \approx \frac{\sigma}{\sqrt{N}} \quad (1.3)$$

Somit ist die Lokalisationsbestimmung umso genauer, desto mehr Photonen detektiert werden. Außerdem ist es notwendig, dass sich benachbarte Signale nicht überlappen, sodass jede PSF als getrennt erkannt wird. Dies wird durch photoschaltbare Fluorophore erreicht, die zeitlich voneinander getrennt aufleuchten und detektiert werden. Photoschaltbare Farbstoffe können reversibel oder irreversibel zwischen einem fluoreszierenden AN-Zustand und einem nicht-fluoreszierenden AUS-Zustand wechseln. Dies garantiert, dass nur sehr wenige Farbstoffe zu jedem Zeitpunkt aktiv sind, sich also im AN-Zustand befinden und somit getrennt voneinander detektiert werden können. Der Großteil der Fluorophore (> 99 %) befindet sich dagegen zu jedem Zeitpunkt im AUS-Zustand. Es gibt verschiedene Methoden, basierend auf photoschaltbare Fluorophore, die sich vor allem in der gegenseitigen Umwandlung der zwei Zustände unterscheiden (Mullisch et al. 2015).

Die photoaktivierte Lokalisationsmikroskopie (engl. *photoactivated localization microscopy*, **PALM**) oder fluoreszierende photoaktivierte Lokalisationsmikroskopie (engl. *fluorescence photoactivated localization microscopy*, **FPALM**) verwendet photoaktivierbare oder photokonvertierbare fluoreszente Proteine (PA-FPs) (Betzig et al. 2006; Hess et al. 2006). Diese werden genetisch an Zielproteine fusioniert und in Zellen oder Organellen exprimiert. Durch einen UV-Laserimpuls werden zufällig einige wenige PA-FPs in einen fluoreszenten AN-Zustand versetzt und so lang mit einem zweiten Emissionslaser angeregt und detektiert bis sie bleichen. Dieser Prozess wird so lang wiederholt bis die gesamte Population an PA-FPs gebleicht wurde. Photoaktivierbare fluoreszente Proteine, wie z.B. PA-GFP, liegen zunächst im AUS-Zustand vor und werden durch UV-Licht irreversibel in den fluoreszenten AN-Zustand gebracht. Photokonvertierbare fluoreszente Proteine dagegen fluoreszieren im Vornherein, wie z.B. mEos2. Ihr Absorptions- und Emissionsspektrum wird durch UV-Bestrahlung zur längeren Wellenlänge hin verschoben. Mit Hilfe geeigneter optischer Filter kann schließlich die rot-verschobene Emission detektiert werden.

Sowohl bei *stochastic optical reconstruction microscopy* (**STORM**) (Rust et al. 2006; Bates et al. 2007) als auch bei *direct STORM* (**dSTORM**) (Heilemann et al. 2008; Heilemann et al. 2009; van de Linde et al. 2011; Klein et al. 2014) werden photoschaltbare organische Farbstoffe verwendet, um eine zeitlich getrennte Einzelmoleküldetektion zu gewährleisten. Im Gegensatz zu PALM sind die Farbstoffe hierbei reversibel schaltbar, d.h. sie können mehrfach zwischen den AN- und AUS-Zuständen wechseln. Um alle Moleküle getrennt voneinander detektieren zu können, befindet sich ein Großteil der Fluorophore im dunklen

AUS-Zustand und nur einige wenige Fluorophore sind aktiv, d.h. im fluoreszierenden AN-Zustand. Zum nachfolgenden Zeitpunkt werden emittierte aktive Fluorophore in den Dunkel-Zustand versetzt, woraufhin eine andere Subpopulation wiederum stochastisch aktiviert und detektiert wird. Dieser Zyklus von Aktivieren und Detektieren wird so lang fortgesetzt bis mehrere tausende Einzelbilder aufgenommen worden sind (Abbildung 1.5). Dabei macht es in der Zeiterie den Eindruck, als würden die Fluorophore blinken. Idealerweise ist der Abstand zweier einzelner Emitter größer als die Beugungsgrenze, da sie nur so getrennt voneinander lokalisiert werden können. Die genaue Position jeder einzelner fluoreszierender Moleküle wird mit Hilfe einer Computersoftware mathematisch genau bestimmt, indem eine zweidimensionale Gaußfunktion an jede PSF angepasst wird. Hierbei kann das Maximum der Gaußfunktion mit Nanometerpräzision bestimmt werden und stellt die Position der einzelnen Fluorophore dar. Anschließend kann aus der Summe aller ermittelten Lokalisationen ein rekonstruiertes hochaufgelöstes Bild mit einer lateralen Auflösung von bis zu 20 nm entstehen.

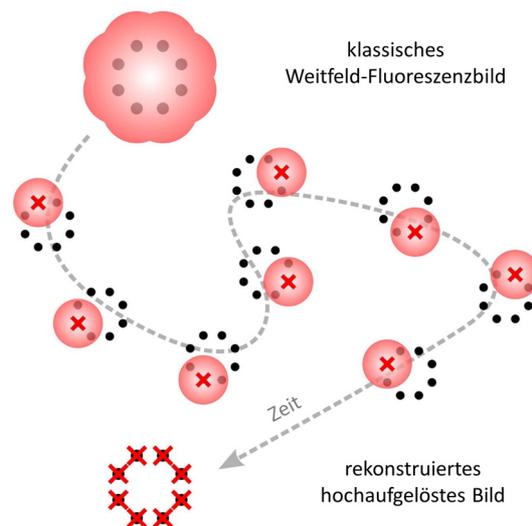


Abbildung 1.5: Das Prinzip der Lokalisationsmikroskopie. Zunächst wird ein Zielprotein mit photoschaltbaren Fluorophoren (schwarze Punkte) angefärbt. Im klassischen Weitfeld-Fluoreszenzbild fluoreszieren alle Farbstoffe und ergeben ein beugungsbegrenztes Bild, da sich die PSFs der einzelnen Fluorophore überlappen. Um alle Moleküle getrennt voneinander zu detektieren, wird die Mehrheit der Fluorophore in den reversiblen dunklen AUS-Zustand versetzt und nur ein sehr kleiner Anteil der Fluorophore ist aktiv, d.h. im AN-Zustand. Im nachfolgenden Zeitpunkt werden aktive Fluorophore in den Dunkel-Zustand gebracht und eine andere Subpopulation stochastisch aktiviert und detektiert. Somit können die einzelnen Emitter zeitlich voneinander lokalisiert und schließlich zu einem hochaufgelösten Bild rekonstruiert werden. Bearbeitet nach van de Linde et al. 2013, mit Erlaubnis von Elsevier.

Im Gegensatz zu PALM, wo sich alle Fluorophore am Anfang des Experiments im AUS-Zustand befinden, müssen sowohl bei STORM als auch bei *d*STORM die anfangs fluoreszierenden Fluorophore zunächst in einen langlebigen stabilen AUS-Zustand gebracht werden. Das perfekte Zusammenspiel zwischen AN- und AUS-Zustand der Farbstoffe wird durch Zugabe von thiolhaltigen Reduktionsmitteln, wie z.B. β -Mercaptoethylamin, und Oxidationsmitteln, z.B. Sauerstoff, erreicht. Wie in Abschnitt 1.3 beschrieben gelangen Fluorophore durch Anregung einer geeigneten Wellenlänge vom Grundzustand (S_0) in den Singulett-Zustand S_1 oder S_2 . Von dort aus können sie in S_0 zurückkehren, indem sie Fluoreszenz abgeben oder durch Interkombinationsübergänge (ISC) strahlungslos in den energetisch niedrigeren Triplett-Zustand (T_1) überwechseln. Durch Reduktion mit einem Thiolat, das sich in millimolaren Konzentrationen im Probenpuffer befindet, können einige Fluorophore von T_1 in den Radikalzustand (R) überwechseln bzw. durch eine weitere Reduktion die voll-reduzierte Leukoform (L) annehmen (Abbildung 1.6). Die beiden reduzierten Zustände R und L stellen einen stabilen nicht-fluoreszierenden AUS-Zustand dar. Durch Oxidation mit Sauerstoff oder der Bestrahlung mit Licht einer niedrigen Wellenlänge (~ 400 nm) können Fluorophore von den Zuständen T_1 , R oder L wieder in den Grundzustand (S_0) gebracht werden. Der Entzug von Sauerstoff, z.B. durch die zusätzliche Zugabe von Glukoseoxidase, Katalase und Glukose, sorgt also dafür, dass Fluorophore länger in den Zuständen T_1 , R oder L verweilen und somit länger im AUS-Zustand bleiben (van de Linde und Sauer 2014). Während man bei STORM ein Fluorophor-Paar, bestehend aus Aktivator und Reporter, die jeweils an denselben Antikörper gekoppelt sind, verwendet, kann bei *d*STORM auf den Aktivator verzichtet werden. Somit werden lediglich kommerzielle organische Fluoreszenzfarbstoffe verwendet (z.B. Alexa Fluor- oder ATTO-Farbstoffe) und unter bestimmten Pufferbedingungen zum Blinken gebracht. In dieser Arbeit wurden unterschiedliche organische Fluoreszenzfarbstoffe, gekoppelt an einen Antikörper bzw. an eine Tetrazingruppe, für *d*STORM verwendet. Somit konnte der NMDA-Rezeptor hochaufgelöst visualisiert werden.

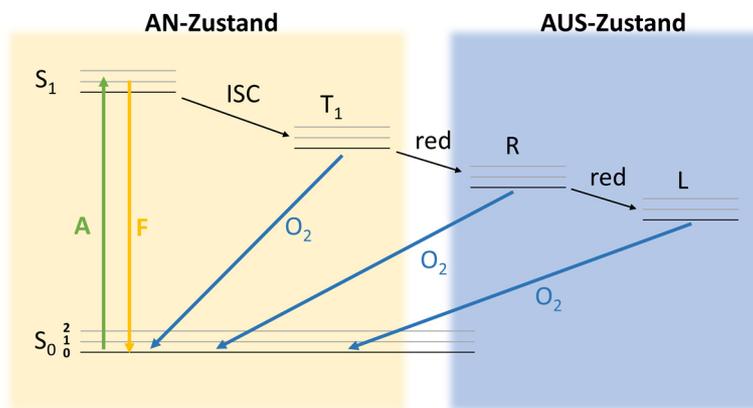


Abbildung 1.6: Reversibles Photoschalten organischer Fluorophore durch thiolhaltige Reduktionsmittel. Durch Anregung (A: Absorption) gelangen Fluorophore vom Grundzustand (S_0) in den Singulett-Zustand S_1 . Von dort aus können sie in den S_0 zurückkehren, indem sie Fluoreszenz (F) abgeben oder durch Interkombinationsübergänge (ISC) in den Triplett-Zustand T_1 übertreten. Von hier aus kann das Fluorophor entweder in den S_0 oxidiert (O_2) werden oder durch Thiolat im Probenpuffer in den Radikalzustand (R) reduziert werden. Einige Fluorophore können erneut reduziert werden und in die voll-reduzierte Leukoform (L) übergehen. Beide Formen können wiederum durch Oxidation mit Sauerstoff (O_2) in den Grundzustand S_0 versetzt werden.

1.4 Markierungsmethoden

Heutzutage existiert eine Vielzahl verschiedener Fluorophore und Färbemethoden, die für Markierungen zellulärer Proteine und Strukturen verwendet werden. Dabei unterscheiden sich die Fluorophore in ihren biochemischen und photophysikalischen Eigenschaften. So werden für die Fluoreszenzmikroskopie beispielsweise fluoreszierende Proteine (z.B. das aus der Qualle *Aequorea victoria* stammende *Green Fluorescent Protein*, GFP), Quantum Dots und organische Fluorophore wie Cyanine und Rhodamine verwendet. Für alle Markierungsmethoden gilt es, das sog. Nyquist Shannon Theorem zu erfüllen (Shannon 1949). Dies besagt, dass die Markierungsdichte einer bestimmten Zielstruktur doppelt so hoch wie die gewünschte Auflösung sein muss. Wenn also eine räumliche Auflösung von 20 nm erzielt werden soll, muss die Struktur alle 10 nm mit einem Fluorophor markiert sein. Im Folgenden werden drei verschiedene Markierungsmethoden dargestellt, die in dieser Arbeit für die Untersuchung von NMDA-Rezeptoren und Gephyrin mittels hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie-Techniken verwendet wurden.

1.4.1 Antikörper

Der spezifische Nachweis von diversen Proteinen oder Strukturen mit Hilfe von Antikörpern ist von großer Bedeutung für die heutige Forschung und Diagnostik. Antikörper sind Teil des humoralen Immunsystems und gehören zur Proteinfamilie der Immunglobuline (Ig). Man unterteilt sie hinsichtlich Größe, Molekulargewicht, Struktur und Funktion in fünf verschiedene Klassen: IgG, IgM, IgA, IgD und IgE. Für sämtliche Immunmarkierungen werden hauptsächlich IgG-Antikörper verwendet. Hierbei wird zwischen der direkten und indirekten Immunmarkierung unterschieden. Bei der direkten Immunmarkierung wird der Epitop-bindende Antikörper an ein Fluorophor gekoppelt und kann somit im Mikroskop sichtbar gemacht werden. Die indirekte Immunmarkierung erfolgt in zwei Schritten. Zunächst wird mit einem Epitop-spezifischen Primärantikörper gefärbt und anschließend mit einem Fluorophor-markierten Sekundärantikörper, der wiederum an den Primärantikörper bindet. Somit kommt es zu einer Signalverstärkung, da mehrere Fluorophor-markierte Sekundärantikörper an einen Primärantikörper binden können. Des Weiteren unterscheidet man zwischen polyklonalen und monoklonalen Antikörpern. Bei der Herstellung polyklonaler Antikörper wird ein Tier (oft Mäuse oder Kaninchen) mit einem Antigen immunisiert, worauf verschiedene spezifische Antikörper gegen verschiedene Epitope des fremden Antigens gebildet werden. Diese diverse Population an Antikörpern stammt von unterschiedlichen B-Zellklonen und wird als polyklonale Antikörper bezeichnet. Diese können mehrere Epitope eines Antigens erkennen, was zu einer weiteren Signalverstärkung führt. Dagegen werden monoklonale Antikörper nur von einem einzigen B-Zellklon produziert und erkennen deshalb ganz spezifisch nur ein einziges Epitop. Da B-Zellen nicht mehr teilungsfähig sind, werden sie mit Tumorzellen (Myelome) hybridisiert, wodurch unsterbliche antikörperproduzierende Hybridomazellen entstehen (Mulisch et al. 2015). Darüber hinaus können monoklonale Antikörper auf gentechnischem Wege über Klonierung und Transformation mit Hilfe von Bakterien, Hefen oder eukaryotischen Zellen gewonnen werden (Kunert und Reinhart 2016). Diese werden als rekombinante Antikörper bezeichnet und können *in vitro* ohne Immunisierung eines Versuchstiers gewonnen werden. Da die DNA-Sequenz der rekombinanten Antikörper bekannt ist, kann diese jederzeit von z.B. *E.coli* Bakterien neu und in unbegrenzten Mengen produziert werden. Weiterhin kann die Spezifität und Affinität rekombinanter Antikörper durch gezielte genetische Manipulation verändert werden. In dieser Arbeit wurden rekombinante monoklonale NMDA-Rezeptor-Antikörper, die freundlicherweise von PD Dr. med. Harald Prüß von der Klinik für Neurologie und experimenteller Neurologie der Charité in Berlin zur Verfügung gestellt

wurden, getestet. PD Dr. med. Harald Prüß und seine Gruppe beschäftigen sich mit Autoantikörper-induzierten gestörten Mechanismen von neuronale Strukturen. Sie konnten einzelne Antikörper-produzierende Zellen aus dem Liquor verschiedener Patienten isolieren und die Antikörper mit Hilfe molekularbiologischer Methoden rekombinant herstellen. Dazu wurde zunächst das monoklonale Antikörperrepertoire von B-Gedächtniszellen und Antikörper-sekretierenden Zellen des Liquors charakterisiert (Kreye et al. 2016). Durch Amplifizierung, Sequenzierung und Klonierung dieser Patientenantikörper wurden verschiedene rekombinante monoklonale Patientenantikörper in transfizierten HEK293T-Zellen hergestellt. Diese Technik ermöglicht den pathogenen Nachweis dieser rekombinanten monoklonalen Patientenantikörper und deren Störung auf die synaptische Übertragung. Außerdem dienen sie als gute Marker für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie in Kombination mit Fluorophor-markierten Sekundärantikörpern. In dieser Arbeit wurden deshalb verschiedene rekombinante monoklonale Patientenantikörper auf ihre Bindungsaffinitäten an die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors sowohl in primären Neuronen als auch in Gehirnschnitten getestet.

Antikörper haben den großen Vorteil, dass sie an fast alle Farbstoffe gekoppelt werden können und somit ein großes Spektrum aufweisen. Jedoch sind sie zugleich auch nachteilig für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie, da sie mit einer Größe von 10 – 15 nm verhältnismäßig groß sind (Abbildung 1.7). Bei einer indirekten Immunmarkierung kann sich der Fluorophor mit einem Abstand von bis zu 30 nm vom Zielprotein entfernt befinden, was eine Auflösungsverminderung bedeutet. Aus diesem Grund werden für Immunfärbungen oft Fab-Fragmente (engl. *antigen binding fragment*) der Antikörper genutzt, die mit einer Größe von 7 – 10 nm etwas kleiner sind (Abbildung 1.7). Fab-Antikörper sind die Antigen-bindenden Fragmente von Antikörpern und werden durch die Spaltung mit dem Enzym Papain hergestellt. Noch kleinere Antikörper konnte man aus dem Blut von Haien (Greenberg et al. 1995) und Kamelen (Hamers-Casterman et al. 1993) isolieren, die nur aus zwei kurzen Peptidketten bestehen. Diese sog. Schwere-Ketten-Antikörper wurden schließlich nochmals verkleinert und bestehen damit nur noch aus einer einzigen variablen Domäne. Damit weisen diese sog. Nanobodies eine Größe von nur ~ 3 nm auf und sind deshalb besonders interessant für die Immunmarkierung der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie (Abbildung 1.7). Nanobodies haben allerdings den Nachteil, dass sie relativ teuer und aufwendig herzustellen sind (Mulisch et al. 2015).

1.4.2 Super-Binde-Peptide

„Super-Binde-Peptide“ (SBPs) sind sehr kleine Peptide mit einer Größe von $\sim 2,5$ nm. Sie wurden ursprünglich entwickelt, um beispielsweise GABA_A-Rezeptoren innerhalb der postsynaptischen Membran zu modulieren und somit diverse neuronale Erkrankungen zu behandeln (Khayenko und Maric 2019). Funktionsstörungen der GABA_A-Rezeptoren können zu Schizophrenie, postpartalen Depressionen, Epilepsie, Alzheimer Erkrankung, Autismus und Schlaganfall führen. Schon seit Beginn des 20. Jahrhunderts gibt es diverse medikamentöse Wirkstoffe gegen neuronale Erkrankungen, die den GABA_A-Rezeptor extrazellulär binden. Jedoch weisen diese Wirkstoffe oft Nebenwirkungen durch deren limitierte Spezifität auf, da sie meist sehr schwer zugängliche extrazelluläre Regionen des Rezeptors binden. Somit versuchte man eine neue Art von Wirkstoffen zu erforschen, indem man GABA_AR-assoziierende Proteine nutzt, um die intrazelluläre Signalisierung zu therapieren. Dazu wurde u.a. das GABA_AR-Regulatorprotein Gephyrin auserwählt, da es die Lokalisierung und das Clustern von GABA_A-Rezeptoren in der postsynaptischen Membran bestimmt (siehe Abschnitt 1.2). Dr. Hans M. Maric et al. führten zunächst thermodynamische und strukturelle Studien durch, um die wichtigen Gephyrin-bindenden Fragmente der GABA_A- und Glycin-Rezeptoren zu identifizieren (Maric et al. 2011; Maric et al. 2014). Anschließend wurden bindungsentscheidende Aminosäuresequenzen optimiert, sodass die Affinitäten um das 46000-fache im Vergleich zum nativen Peptid erhöht werden konnten (Maric et al. 2015; Maric et al. 2017). Weitere *in vitro* Versuche konnten schließlich zeigen, dass die neuen SBPs das Clustern von GABA_A-Rezeptoren (mit $\alpha 2$ -Untereinheit) auf der Postsynapse reduzieren und damit ein vielversprechender Wirkstoff sind, um die synaptische Inhibierung zu modulieren (Maric et al. 2017). Weitere Studien zeigten bereits, dass die Interaktion zwischen NMDA-Rezeptoren und dem intrazellulären Ankerprotein PSD-95 durch Peptide inhibiert werden konnte, wobei sich zwei dieser Peptide derzeit in präklinischer und klinischer Entwicklung befinden (Aarts et al. 2002; Bach et al. 2010; Cook et al. 2012; Bach et al. 2012). Aufgrund ihrer vergleichbar geringeren Größe von nur $\sim 2,5$ nm sind SBPs ebenfalls sehr gut für Färbungen der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie geeignet (Abbildung 1.7). Aus diesem Grund stellten Dr. Hans M. Maric et al. zusätzliche SBPs her, die Farbstoff-gekoppelt für die Super-Resolution-Mikroskopie verwendet werden können (Maric et al. 2017). Mit Hilfe einer Microarray-Technologie wurde zunächst die Konsensussequenz für die Gephyrin-Bindung mit Hilfe der β -Untereinheit des Glycin-Rezeptors ermittelt. Durch Einbringen verschiedenster Mutationen konnten anschließend die Bindeaffinität, Spezifität und Zellpermeabilität der Peptide erhöht werden. Da

die Gephyrin E-Domäne natürlicherweise als Dimer vorzufinden ist, wurden dimere Peptide synthetisiert, die die Affinität erstaunlicherweise bis zu 46000-fach erhöhten. Da Dimere allerdings verminderte Bindeaffinitäten in Kombination mit zellpenetrierenden und fluoreszenten Resten aufwiesen, wurden für Färbungen weiterhin monomere Peptide verwendet. Somit konnte ein kleines, hochspezifisches und effektiv bindendes Peptid für das Synapsen-Ankerprotein Gephyrin entwickelt werden, das aminoterminal an den Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodamin (TMR) gebunden ist. Die Spezifität dieser hochaffinen Gephyrin-SBPs wurde in dieser Arbeit erstmals in primären Neuronen getestet und mit kommerziellen Gephyrin-Antikörpern verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass Gephyrin-SBPs durchaus optimale Marker für die inhibitorische Postsynapse sind.

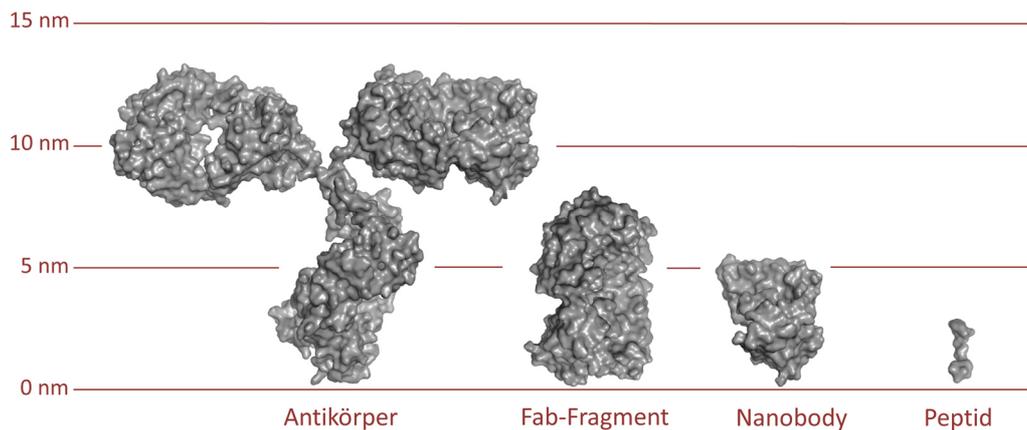


Abbildung 1.7: Größenvergleich von Antikörpern, Fab-Fragmenten, Nanobodies und Peptiden. IgG-Antikörper (Protein-Datenbank PDB: 1IGT) sind mit einer Größe von 10-15 nm sehr groß für die Markierung von Zielproteinen. Deren Antigen-Binde-Region, sog. Fab-Fragment (Protein-Datenbank PDB: 1IGT) ist dagegen mit einer Größe von 7-10 nm etwas kleiner und wird daher oft für die indirekte Immunfärbung verwendet. Nanobodies (Protein-Datenbank PDB: 2QTJ) (~ 3 nm) sind einzelne variable Domänen eines Antikörpers und werden aus dem Blut von Kamelen oder Haien gewonnen. Super-Binde-Peptide (hier das Gephyrin-SBP gezeigt, Protein-Datenbank PDB: 4U90) sind mit einer Größe von $\sim 2,5$ nm sehr klein und damit sehr gut für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie geeignet.

1.4.3 Bioorthogonale Click-Färbung durch die Erweiterung des genetischen Codes

Die Erweiterung des genetischen Codes (engl. *genetic code expansion*, GCE) ist eine ideale Methode, um Proteine genetisch zu manipulieren, indem eine zusätzliche unnatürliche, nicht-kanonische Aminosäure (engl. *non-canonical amino acid*, ncAA) ins Zielprotein eingebaut wird. In Kombination mit der Click-Chemie kann diese ncAA schließlich ortsspezifisch mit organischen Fluorophoren angefärbt werden, sodass Proteindynamiken sowohl *in vitro* als auch *in vivo* erforscht werden können (Wang und Schultz 2004; Liu und Schultz 2010; Lemke 2014; Lang und Chin 2014). Organische Fluoreszenzfarbstoffe sind für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie von großer Bedeutung, da sie mit einer Größe von 0,5 – 2 nm sehr klein sind und damit die natürlichen Funktionen der Proteine in der Zelle kaum beeinflussen. Außerdem können sie hohe Photostabilitäten und eine große Vielfalt spektraler Farben aufweisen und haben damit ideale photophysikalische Eigenschaften für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie (van de Linde et al. 2012). Ein weiterer großer Vorteil des GCE ist die Ortsspezifität, d.h. eine einzige Aminosäure ist mit einem Fluorophor kovalent markiert, was eine stöchiometrische und quantitative Auswertung erlaubt.

Die normale Proteinbiosynthese findet an den Ribosomen im Cytoplasma der Zelle statt. Hierbei wird die mRNA in die codierende Aminosäuresequenz eines Polypeptids übersetzt und ein Protein gebildet. Zudem werden tRNAs von Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (RS) mit den entsprechenden Aminosäuren beladen und binden während der Translation an das passende Codon auf der mRNA, wodurch die Aminosäure an die entstehende Polypeptidkette gebunden wird. Die Übersetzung der drei aufeinanderfolgenden Nukleinbasen, auch Codon genannt, in eine bestimmte Aminosäure wird als genetischer Code bezeichnet. Dieser besteht aus 64 möglichen Triplettcodons, davon codieren 61 (*Sense-Codons*) für die insgesamt 20 kanonischen Aminosäuren und die restlichen drei stellen sog. Stopcodons (*Nonsense-Codons*) dar. Letztere haben keine zugehörige tRNA und führen bei der Proteinbiosynthese zum Abbruch der Translation. Das Stopcodon UAG wird als *Amber*, UAA als *Ochre* und UGA als *Opal* bezeichnet (Schmidt 2017). Man hat jedoch in einigen *Archaea*, Bakterien und Eukaryoten den Einbau einer weiteren nicht-kanonischen Aminosäure Selenocystein über das *Opal*-Stopcodon (UGA) entdeckt (Böck et al. 1991). Selenocystein wird als 21. natürliche Aminosäure bezeichnet und kann durch Bereitstellung einer nicht-kanonischen Aminoacyl-tRNA und passender RS über das *Opal*-Stopcodon

eingebaut werden. In diesem Fall fungiert das *Opal*-Codon also nicht mehr als *Nonsense*-Codon, sondern erlaubt den Einbau von Selenocystein während der Proteinbiosynthese. Erst im Jahre 2002 wurde die 22. natürliche Aminosäure entdeckt – Pyrrolysin (Klass et al. 2002). Diese ist nur in der Archaeagattung *Methanosarcina*, im Bakterium *Desulfitobacterium hafniense* und dem Gürtelwurm *Olavius algarvensis* zu finden und wird über das *Amber*-Codon (UAG) codiert (Klass et al. 2002; Zhang und Gladyshev 2007). Mit Hilfe einer orthogonalen Pyrrolysin-tRNA und der dazugehörigen Pyrrolysin-tRNA-Synthetase (tRNA^{Pyl}/PylRS) wird die nicht-kanonische Aminosäure Pyrrolysin bei Erscheinen des *Amber*-Codons während der Proteinbiosynthese eingebaut.

Für die Erweiterung des genetischen Codes wird besonders häufig die *Amber*-Suppressionsmethode verwendet, da das UAG-Stopcodon im Gegensatz zu den beiden anderen Stopcodons am seltensten als Terminator in der Zelle verwendet wird (Kim et al. 2013; Wang et al. 2006). Hierbei wird also das *Nonsense*-UAG-Codon in ein *Sense*-Codon umgewandelt, um eine zusätzliche unnatürliche ncAA ins Genom einzubauen. Dazu wird in erster Linie ein *Amber*-Codon mit Hilfe molekularbiologischer Methoden in eine gewünschte Position des Zielproteins mutiert. Sowohl das mutierte Zielprotein als auch die orthogonale tRNA mit passender orthogonaler RS (tRNA/RS-Paar) werden über Transfektion in der Zelle exprimiert. Hierbei ist die Orthogonalität von großer Bedeutung, d.h. sowohl die neue tRNA als auch die neue RS dürfen nicht mit den nativen tRNAs oder RS wechselwirken bzw. kreuzreagieren, geschweige denn natürliche Aminosäuren binden. Zusätzlich wird die passende ncAA ins Zellmedium zugegeben. Auf diese Weise produziert die Zelle neben kanonischen auch orthogonale tRNAs, die durch die zugehörige orthogonale RS spezifisch mit der passenden ncAA beladen wird (Abbildung 1.8 B). Sobald das *Amber*-Codon auf der abgelesenen mRNA im Ribosom während der Translation erscheint, bindet das Anticodon der beladenen orthogonalen tRNA und die ncAA wird in die Polypeptidkette eingebaut. Somit erhält man ein Zielprotein, das eine ncAA trägt. Sobald nicht ausreichend ncAAs in den Zellen vorhanden sind, können die orthogonalen tRNAs nicht beladen werden, wodurch das *Amber*-Codon die Translation terminiert und somit das Zielprotein nicht vollständig exprimiert wird. Im Idealfall wird ein fluoreszierendes Protein (z.B. GFP) carboxyterminal, also nach dem Zielgen mit der *Amber*-Mutation, auf dem Plasmidvektor des Zielproteins als Positivkontrolle eingebaut (Abbildung 1.8 A). Somit wird GFP immer nur dann exprimiert, wenn die *Amber*-Mutation durch den ncAA-Einbau unterdrückt wurde (Nikić et al. 2015). Die eingebaute ncAA lässt sich schließlich mit Click-Chemie spezifisch anfärben (Abbildung 1.8 C). Hierfür wurde die ncAA chemisch so verändert, dass sie entweder ein Alken oder ein Alkin trägt. Der Farbstoff dagegen trägt eine Azid-

oder Tetrazingruppe. Für die Färbung können zwei verschiedene kupferfreie Click-Reaktionstypen verwendet werden: SPAAC (engl. *Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition*) oder SPIEDAC (engl. *Strain-promoted inverse-electron-demand Diels-Alder cycloaddition*). Beide Reaktionen sind biokompatibel und können unter physiologischen Bedingungen ablaufen, ohne einen möglichen zelltoxischen Katalysator (wie z.B. Kupfer) zufügen zu müssen. So sind z.B. Kupfer-katalysierte Click-Reaktionen wesentlich toxischer für lebende Zellen als bioorthogonale Markierungsmethoden, da sie Apoptose verursachen und die Zellproliferation beeinträchtigen (Sletten und Bertozzi 2009; Wolbers et al. 2006). Im Jahre 2004 entwickelten Bertozzi et al. deshalb die erste kupferfreie Click-Chemie-Reaktion, die unter physiologischen Bedingungen ohne Katalysator ablaufen kann (Agard et al. 2004). Bei dieser sog. SPAAC-Reaktion wird eine [3+2] Cycloaddition eines gespannten zyklischen Alkins (sog. Cycloalkin) mit einem Azid eingegangen, wodurch ein aromatischer Triazolring entsteht. Da SPAAC im Vergleich zur Kupfer-katalysierten Click-Reaktion verhältnismäßig langsam abläuft, wurden neue kleinere Cycloalkine synthetisiert, sog. Cyclooctyne (z.B. DIBCO und BCN), die die Reaktionsgeschwindigkeit durch eine sterische Spannung beschleunigen (Dommerholt et al. 2016). Die SPIEDAC stellt dagegen eine noch schnellere Reaktion dar, bei der ein zyklisches Alken (sog. Cycloalken) oder Alkin (sog. Cycloalkin) eine kovalente Bindung mit einem Tetrazin durch eine [4+2] Cycloaddition eingeht, wodurch ein heteroaromatischer Sechsering entsteht (Oliveira et al. 2017). Um die SPIEDAC-Reaktion wiederum zu beschleunigen wurden besonders kleine Cycloalkene mit sehr hoher sterischer Spannung synthetisiert, die sog. Cyclooctene. Das *trans*-Cycloocten (TCO) weist unter den Cyclooctenen die höchste Reaktivität auf und wird deshalb bevorzugt in ncAAs eingebaut und für die bioorthogonale Click-Reaktion durch GCE verwendet (Selvaraj und Fox 2013). So kann die Inkubation eines Tetrazin-Farbstoffs, das ein Konjugat zwischen Farbstoff und Tetrazingruppe darstellt, bei der SPIEDAC in einem Zeitfenster von einigen Sekunden bis Minuten liegen, wobei die SPAAC wesentlich längere Inkubationszeiten oder höhere Farbstoffkonzentrationen benötigt (Nikić et al. 2015). Durch beide Reaktionen entstehen kovalente Bindungen, sodass sich der gebundene Farbstoff nicht mehr von der ncAA lösen kann, was stöchiometrische quantitative Analysen erlaubt.

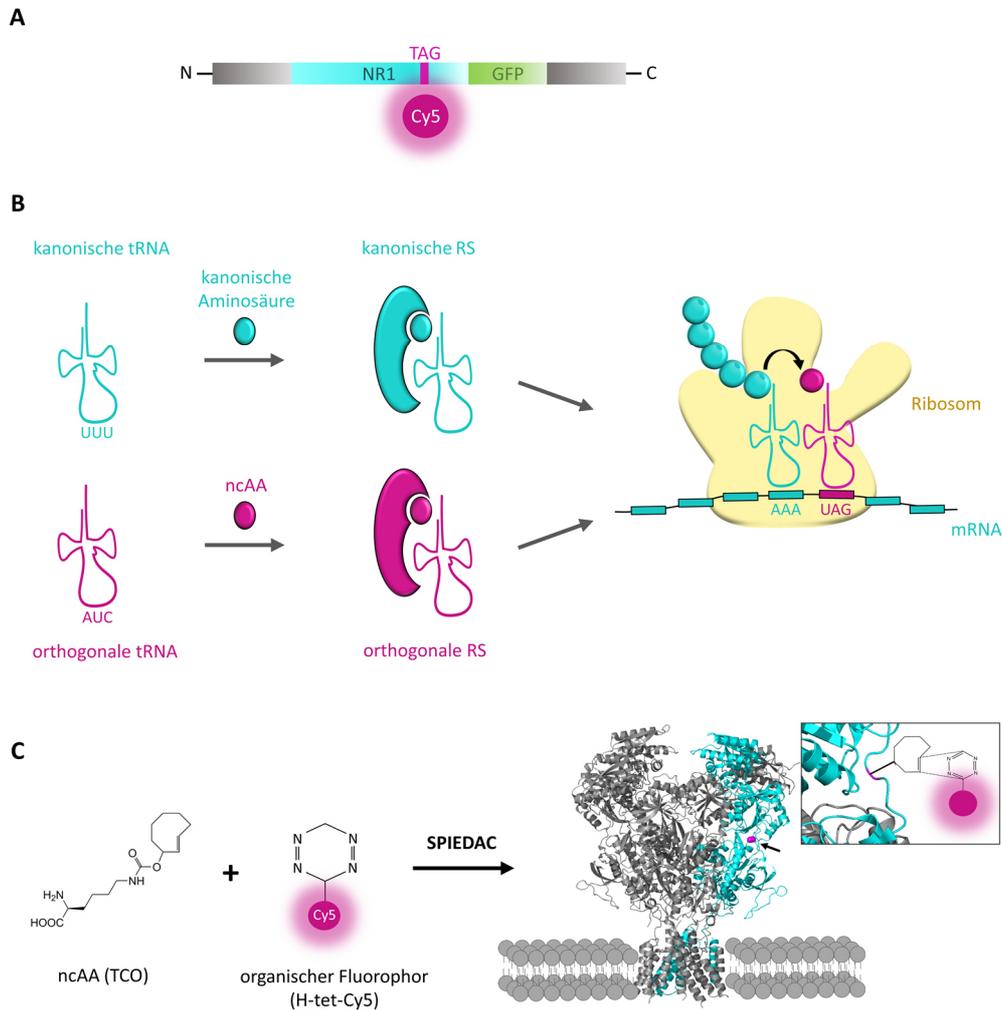


Abbildung 1.8: Bioorthogonale Click-Färbung durch die Erweiterung des genetischen Codes. (A) Bei der *Amber*-Suppressionsmethode wird das *Amber*-Stopcodon zum Einbau einer nicht-kanonischen Aminosäure (ncAA) verwendet. Idealerweise trägt der Plasmidvektor des Zielproteins carboxyterminal vom Zielgen mit *Amber*-Mutation (TAG auf der DNA) ein GFP als Positivkontrolle. GFP wird also immer nur dann exprimiert, wenn die *Amber*-Mutation durch den ncAA-Einbau unterdrückt wurde. (B) Das Zielprotein mit *Amber*-Mutation wird zusammen mit einer orthogonalen tRNA und einer orthogonalen tRNA-Synthetase (RS) in der Zelle exprimiert. Nach Zugabe der ncAA, wird diese mit Hilfe der orthogonalen RS auf die orthogonale tRNA beladen. Sobald das *Amber*-Codon (UAG) auf der mRNA während der Translation erscheint, wird die ncAA in die Polypeptidkette eingebaut. Dabei kreuzreagiert oder wechselwirkt die natürliche translationale Maschine nicht mit der unnatürlichen (Orthogonalität). (C) Die eingebaute ncAA lässt sich über eine Click-Reaktion spezifisch anfärben (hier mittels SPIEDAC gezeigt). Die ncAA L-Lysin enthält ein *trans*-Cycloocten (TCO), das mit dem organischen Farbstoffkonjugat Tetrazin-Cy5 (H-tet-Cy5) eine kovalente Bindung eingeht. Mit Erlaubnis bearbeitet nach Neubert et al. 2018, © 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Mittlerweile konnten mit Hilfe der GCE-Methode schon bis zu 71 verschiedene ncAAs in Proteine eingebaut werden (Liu und Schultz 2010). Diese sind den natürlich vorkommenden Aminosäuren sehr ähnlich, tragen aber normalerweise synthetisierte veränderte Seitenketten, wie z.B. photoschaltbare Gruppen. NcAAs müssen so synthetisiert werden, dass sie metabolisch stabil sind, eine gute zelluläre Bioverfügbarkeit haben und vom ribosomalen Elongationsfaktor EF-Tu toleriert werden. Außerdem dürfen sie keinesfalls von endogenen natürlichen RS erkannt werden, d.h. sie müssen orthogonal sein. Um zwei ncAAs gleichzeitig ins Genom einzubauen, können verschiedene ncAAs zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Zelltransfektion in das Zellmedium zugegeben werden und schließlich mit mehreren Click-Farbstoffen angefärbt werden. Dabei wird eine ncAA mittels SPAAC und die andere ncAA mittels SPIEDAC gefärbt (Nikić und Lemke 2015). Bei dieser Methode wird allerdings die gleiche Position des Zielproteins angefärbt, nur mit zwei unterschiedlichen Farbstoffen. Um mehrere ncAAs an unterschiedlichen Stellen im Genom einzubauen, können weitere *Nonsense*-Stopcodons (also UAA- oder UGA-Stopcodons) verwendet werden. Hierfür werden zwei verschiedene tRNA/RS-Paare in der Zelle exprimiert, die wiederum zwei verschiedene ncAAs ins Protein einbauen können und anschließend mit unterschiedlichen Tetrazin-Farbstoffen gefärbt werden können. Allerdings ist die Anzahl an *Nonsense*-Codons begrenzt, sodass weitere ncAAs durch sog. Quadruplett-Codons, oder auch Frameshift-Codons genannt, eingebaut werden können (Anderson et al. 2004; Hohsaka et al. 1996; Wang et al. 2012). Hierfür wurde eine orthogonale tRNA mit einem Quadruplett-Anticodon, bestehend aus vier nacheinander folgenden Basen, und eine zugehörige RS entwickelt. Sobald das Quadruplett-Codon auf der abzulesenden mRNA erscheint, kann das passende Quadruplett-Anticodon der tRNA binden und die ncAA selektiv eingebaut werden. Dies verursacht einen +1 Frameshift. Falls das Quadruplett-Codon zufällig nicht eingebaut wird, kommt es nicht zum +1 Frameshift in der Sequenz und die Translation wird durch ein zusätzlich eingebautes Stopcodon terminiert (Hohsaka et al. 1996). Dadurch entsteht ein verkürztes, nicht funktionsfähiges Proteinfragment, was von der Zelle abgebaut wird.

Neben den zahlreichen Vorteilen von GCE, sei es für die Färbung von Membranproteinen als auch intrazelluläre Färbungen, gibt es ebenso einige Herausforderungen und Nachteile, die diese Methode mit sich bringt. So muss immer eine Zelltransfektion durchgeführt werden, um das gewünschte *Amber*-Codon zu exprimieren. Dies ist ein Eingriff in die natürliche Zellphysiologie, bei der die Zelle dazu gezwungen wird, etwas Unnatürliches zu produzieren. Es ist bisher noch nicht geklärt, ob eine Stopcodon-Suppression Einfluss auf den natürlichen Zellzyklus hat. Wang et al. konnten zeigen, dass *E.coli* Bakterien eine relativ schnelle

Anpassung an die Codon-Suppression aufweisen, indem sie mit Hilfe von Transposons die orthogonale RS inaktivieren und somit dem Suppressionsdruck entgegenwirken (Wang et al. 2014). Ob es einen solchen Mechanismus ebenfalls in eukaryotischen Zellen gibt, ist bislang unklar. Darüber hinaus kann GCE zum unerwünschten Unterdrücken von natürlich vorkommenden Stopcodons führen, was Auswirkungen auf die Zelle haben könnte. Außerdem kommt es immer wieder zu zufälligem Nicht-Einbau der gewünschten ncAA, wodurch das abgelesene *Amber*-Stopcodon die Translation vorzeitig beendet. Dadurch entstehen unvollständige, verkürzte Proteinfragmente, die sich in der Zelle anhäufen und diese ggf. beeinflussen könnten.

In dieser Arbeit wurde die Methode der bioorthogonalen Click-Chemie durch GCE verwendet, um den postsynaptischen NMDA-Rezeptor mit einer möglichst kleinen Markierung für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie zu markieren. Der NMDA-Rezeptor ist sehr gut für diese Methode geeignet, da er ein extrazelluläres membranständiges Protein darstellt und sich somit sehr gut mit Tetrazin-Farbstoffen, die die Zellmembran nicht penetrieren, anfärben lässt. Außerdem zeigt der NMDA-Rezeptor eine gute *in vitro* Expression.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologie

Für das Anfärben der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors mittels bioorthogonaler Click-Chemie durch die Erweiterung des eukaryotischen genetischen Codes (GCE) musste zunächst ein NR1-Plasmid modifiziert werden, sodass sich ein *Amber*-Stopcodon an der extrazellulären DNA-Sequenz befindet. Im Folgenden wird beschrieben, wie verschiedene Plasmide mit einer spezifischen *Amber*-Mutation hergestellt und amplifiziert wurden.

2.1.1 Ortsspezifische Mutagenese mittels QuikChange PCR

Das NMDAR-NR1:EGFP Plasmid (freundlicherweise von Prof. Noam Ziv aus Haifa in Israel zur Verfügung gestellt) wurde mit Hilfe PCR-basierter ortsspezifischer Mutagenese gezielt modifiziert, um ein TAG *Amber*-Stopcodon in die DNA einzubringen. Hierfür wurden zunächst mutagene Primerpaare hergestellt (Sigma-Aldrich), die jeweils eine TAG-Punktmutation enthielten (Tabelle 2.1). Es wurden jeweils sieben verschiedene Punktmutationen (K275TAG, K298TAG, K378TAG, K388TAG, Y392TAG, S395TAG und K421TAG) mittels QuikChange PCR (New England Biolabs, #M0491S) eingefügt, vervielfältigt (Tabelle 2.2 und 2.3) und über Gelelektrophorese ihrer Länge nach aufgetrennt.

2 Material und Methoden

Tabelle 2.1: Liste der verwendeten Primer für die ortsspezifische Mutagenese (von Sigma-Aldrich hergestellt)

Bezeichnung	Sequenz
forward K275TAG	5'-GCTCATCAATGGCTAGAAATGAGTCAGCCC- 3'
reverse K275TAG	5'-GGGCTGACTCATTCTAGCCATTGATGAGC- 3'
forward K298TAG	5'-GTTACGAACTCCTAGAGTAGGAGAATATCACTGACC- 3'
reverse K298TAG	5'-GGTCAGTGATATTCTCCTACTCTAGGAGTTTCGTGAAC- 3'
forward K378TAG	5'-CCCAAATGACAGGTAGATCATCTGGCCAGG- 3'
reverse K378TAG	5'-CCTGGCCAGATGATCTACCTGTCATTTGGG- 3'
forward K388TAG	5'-GGAGAGACAGAGTAGCCTCGAGGATAACCAGATG- 3'
reverse K388TAG	5'-CATCTGGTATCCTCGAGGCTACTCTGTCTCTCC- 3'
forward Y392TAG	5'-GAGAAACCTCGAGGATAGCAGATGTCCACCAG- 3'
reverse Y392TAG	5'-CTGGTGGACATCTGCTATCCTCGAGGTTTCTC- 3'
forward S395TAG	5'-CCTCGAGGATAACCAGATGTAGACCAGACTAAAGATAG- 3'
reverse S395TAG	5'-CTATCTTTAGTCTGGTCTACATCTGGTATCCTCGAGG- 3'
forward K421TAG	5'-GAGTGATGGGACATGCTAGGAGGAGTTCACAGTCAATGG- 3'
reverse K421TAG	5'-CCATTGACTGTGAACTCCTCCTAGCATGTCCATCACTC- 3'

Tabelle 2.2: Reaktionsansatz der QuikChange PCR

Volumen	Reagenz
auf 50 μ l	ddH ₂ O
10 μ l	5 x Q5 Reaction Puffer (New England Biolabs, #M0491S)
10 μ l	5 x Q5 High GC Enhancer Puffer (New England Biolabs, #M0491S)
1 μ l	25 mM dNTPs (Sigma-Aldrich, #DNTP100A-1KT)
1 μ l (50 ng)	Template DNA (NR1:EGFP Plasmid)
0,5 μ l (125 ng/ μ l)	forward Primer (Sigma-Aldrich)
0,5 μ l (125 ng/ μ l)	reverse Primer (Sigma-Aldrich)
1 μ l	Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, #M0491S)

Tabelle 2.3: QuikChange PCR Programm (C1000 Thermal Cycler von Bio-RAD)

Zyklen	Anzahl	Temperatur	Zeitdauer	Reaktionsschritt
1	1 x	98 °C	30 s	initiale Denaturierung
2	20 x	98 °C	30 s	Denaturierung
		65 - 68 °C	30 s	Primerhybridisierung
		72 °C	150 s	Elongation
3	1 x	72 °C	180 s	finale Verlängerung
4	1 x	4 °C	∞	Kühlung

2.1.2 Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese wird die DNA über ein 1 % Agarose-Gel durch ein elektrisches Feld ihrer Länge nach aufgetrennt. Die negativ geladene DNA wandert zur Anode, wobei sich kurze Fragmente schneller durch das Gel bewegen als längere und somit voneinander getrennt werden. Hierfür wurde 1 % Agarose (Sigma-Aldrich) in 0,5x TBE-Puffer (Tabelle 2.4) aufgekocht und 5 μ l Safe View (Applied Biological Materials, #G108) zugegeben, um die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen. Das Gel wurde anschließend in die Gelkammer (Bio-RAD) gegossen und ausgehärtet. Als Laufpuffer diente 0,5x TBE-Puffer. In die Gel-Taschen wurden 10 μ l des PCR-Produkts mit 2 μ l des Farbmärkers DNA Gel Loading Dye (6x, Thermo Fisher Scientific, #R0611) gegeben und bei einer Spannung von 100 V, einer Stromstärke von 100 mA und einer Leistung von 4,5 W ca. 1 Stunde nach ihrer Größe aufgetrennt. Eine DNA-Leiter (New England Biolabs, #N0551L) diente als Größenreferenz. Die DNA-Banden wurden anschließend auf einem UV-Tisch (Intras) sichtbar gemacht.

Tabelle 2.4: Protokoll für die Herstellung von 5x TBE-Puffer

Volumen	Reagenz
27 g	Tris (Sigma-Aldrich)
13,8 g	Borsäure (Merck)
10 ml	EDTA (0,5 M, pH 8,0) (Roth)
auf 0,5 l	ddH ₂ O

2.1.3 Restriktionsendonukleasen-Verdau

Nach der QuikChange PCR wurde die methylierte Template-DNA entfernt, indem mit der Restriktionsendonuklease DpnI geschnitten und verdaut wurde. Das Template-Plasmid stammt von Bakterien, die DNA-Methylierung als Kontrollmechanismus verwenden. Somit lässt sich methylierte Template-DNA von neu synthetisierter, nicht methylierter DNA unterscheiden. Letztere enthält die *Amber*-Punktmutation und wurde mittels DpnI-Enzym isoliert, welches methylierte DNA erkennt und schneidet. Für den DpnI-Verdau wurden 40 μl des PCR-Produkts mit 1 μl DpnI-Enzym (20 U/ml, New England Biolabs, #R0176S) für 90 Minuten bei 37 °C inkubiert, um eine anschließende Transformation durchzuführen.

Darüber hinaus wurde ein Y392TAG-NR1-Plasmid ohne carboxyterminales EGFP hergestellt, um Zwei-Farben Click-Färbungen durchzuführen. Hierfür wurde enzymatisch an der entsprechenden BamHI Restriktionsschnittstelle, die die EGFP-Sequenz umgibt, geschnitten. Es wurden 1 μg DNA mit 5 μl NEBuffer 3.1 (10x, New England Biolabs, #B7203S) und 1 μl BamHI-Enzym (20 U/ml, New England Biolabs, #R0136S) gemischt und auf ein Gesamtvolumen von 50 μl mit dH₂O aufgefüllt. Nach einer Inkubation von 1 Stunde bei 37 °C konnte eine Gelelektrophorese durchgeführt werden, um zu kontrollieren ob zwei Banden sichtbar waren.

2.1.4 Transformation und Bakterienkultur

Um die mutierte TAG-NR1-DNA in *E.coli* Bakterien einzubringen und dort zu vervielfältigen, wurden chemisch kompetente *E.coli* XL1-Blue-Zellen verwendet. Diese wurden nach dem Protokoll von Inoue et al. hergestellt (Inoue et al. 1990). Für die Transformation eines Plasmids mit einem Kanamycin-Resistenzgen (NR1-Plasmide) wurde ein Aliquot der XL1-Blue-Zellen auf Eis aufgetaut, 3 – 5 μl der QuikChange PCR-Produkt-DNA in 40 μl XL1-Blue-Zellen zugegeben und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 60 Sekunden folgte eine 2 minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurden 210 μl TY-Medium (Tabelle 2.5) zugegeben und für 45 Minuten bei 37 °C geschüttelt. Die Transformation eines Plasmids mit Ampicillin-Resistenz (NR2B- und tRNA^{Pyl}/NESPyIRS^{AF}-Plasmide) verlief dagegen schneller. Hier wurden XL1-Blue-Zellen auf Eis aufgetaut, 3 – 5 μl der QuikChange PCR-Produkt-DNA in 40 μl XL1-Blue-Zellen zugegeben und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden sowohl die Bakterien mit Kanamycin-Plasmid als auch mit Ampicillin-Plasmid jeweils mit 35 μl bzw. 180 μl auf TY-Agarplatten (Tabelle 2.6) mit der jeweiligen

Antibiotikaresistenz ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von einem positiven Klon wurde am nächsten Tag eine Übernachtskultur in 5 ml TY-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (50 µg/ml Kanamycin, 100 µg/ml Ampicillin) angelegt und über Nacht bei 37 °C und 190 rpm geschüttelt, um die *E.coli* Bakterien weiterhin zu vermehren.

Tabelle 2.5: Protokoll für die Herstellung von TY-Medium. Das TY-Medium wurde nach dem Ansetzen auf den pH-Wert 7,4 eingestellt und für 15 Minuten bei 121 °C sterilisiert.

Volumen	Reagenz
16 g	Trypton (Melford Biolaboratories)
10 g	Hefeextrakt (Melford Biolaboratories)
5 g	NaCl (Merck)
auf 1 l	ddH ₂ O

Tabelle 2.6: Protokoll für die Herstellung von TY-Agarplatten. Trypton, Hefeextrakt und NaCl wurden in ddH₂O auf pH 7,4 eingestellt und autoklaviert. Schließlich wurden Agar und Kanamycin- bzw. Ampicillin-Antibiotikum zugegeben. Nach kurzem Abkühlen konnte der TY-Agar in sterile Petrischalen gegossen, ausgehärtet und bei 4 °C gelagert werden.

Volumen	Reagenz
10 g	Trypton (Melford Biolaboratories)
5 g	Hefeextrakt (Melford Biolaboratories)
8 g	NaCl (Merck)
15 g	Agar (Sigma-Aldrich)
50 µg/ml bzw. 100 µg/ml	Kanamycin bzw. Ampicillin (Sigma-Aldrich)
auf 1 l	ddH ₂ O

2.1.5 Isolierung der Plasmid-DNA und Sequenzierung

Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte aus bakteriellen Übernachtskulturen gemäß des Herstellerprotokolls (Mini-Prep: Macherey-Nagel, #740420.50; bzw. Midi-Prep: Roche, #11754777001). Die DNA wurde abschließend mit der entsprechenden Menge eluiert und in einem Volumen von 20 µl und einer Konzentration von 30 – 100 ng/µl zur Sequenzierung zu eurofins Genomics

geschickt. Die zur Sequenzierung notwendigen Primer wurden auf deren Homepage ausgewählt.

2.2 Zellkultur

In dieser Arbeit wurden HEK293T- (Leibnitz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, #ACC635), COS-7- (Cell Lines Service GmbH, Eppelheim) und NG108-15- (ATCC, #HB-12317) Zellen verwendet. Diese wurden standardmäßig in T-25 Kulturflaschen (Thermo Fisher Scientific, #156340) bei 37 °C und 5 % CO₂ im folgenden Nährmedium kultiviert: DMEM (Sigma-Aldrich, #D8062) mit 10 % FCS (Sigma-Aldrich, #F7524), 1 % L-Glutamin (bereits in DMEM zugesetzt) und 1 % Penicillin-Streptomycin (Sigma-Aldrich, #P4333) und bei einer Konfluenz von ca. 80 % passagiert. Zur Zelltransfektion wurden 8×10^4 – 1×10^5 der jeweiligen Zellen pro Well auf 0,01 % Poly-D-Lysine (Sigma-Aldrich, #P6407) beschichteten 4-Well-Lab-TekII-Deckglaskammern (Nunc, #155382) ausgesät und nach einem Tag Inkubation unter Kulturbedingungen transfiziert. Die Zellkulturarbeiten, insbesondere das Kultivieren, Passagieren und Aussäen von HEK293T- und COS-7-Zellen, wurden vor allem von Lisa Behringer-Pließ und Petra Geßner durchgeführt.

2.2.1 Transfektion und nicht-kanonische Aminosäuren

HEK293T-, COS-7- oder NG108-15-Zellen wurden nach einer 60 – 80 %igen Konfluenz mit JetPRIME Transfektionsreagenz (Polyplus, VWR, #114-01) transfiziert (Abbildung 2.1). Hierbei wurde ein geeignetes Plasmid-Transfektionsreagenz-Mischungsverhältnis von 1 µg DNA mit 2 µl Transfektionsreagenz verwendet (gemäß des Herstellerprotokolls). Die drei Vektoren TAG-NR1, NR2B (freundlicherweise von Dr. Georg Köhr aus Heidelberg zur Verfügung gestellt) und pCMV tRNA^{Pyl}/NESPyIRS^{AF} (freundlicherweise von Edward Lemke aus Heidelberg zur Verfügung gestellt) wurden in einem 1:1:1 Verhältnis transfiziert, wobei die Gesamt-DNA-Menge 500 ng pro Plasmid und pro Well betrug. Eine Koexpression mit NR2B (CMV-pRK5) war notwendig, um einen funktional aktiven NMDA-Rezeptor in der Zellmembran exprimieren zu können (Akashi et al. 2009; Kumar 2015). Kurz vor der Transfektion wurden 0,225 mg/ml des Kanalblockers (±)-Ketaminhydrochlorid (Sigma-Aldrich, #SLBH9550V) zu den Zellen hinzugefügt, um Kalziumeinströmungen in die Zelle zu verhindern (Emnett et al. 2013;

Guo et al. 2017). Die nicht-kanonische Aminosäure *trans*-Cyclooct-2-en-L-Lysin TCO*A (SiChem GmbH Bremen, #SC-8008) wurde in einer Konzentration von $250 \mu\text{M}$, 1:4 in 1M HEPES (Sigma-Aldrich, #H0887) verdünnt, für 4 – 8 Stunden zugegeben. Anschließend wurde das Zellmedium gewechselt, ohne erneut TCO*A hinzuzufügen. Nach weiteren 12 – 36 Stunden wurden die Zellen mittels bioorthogonaler Click-Chemie angefärbt.

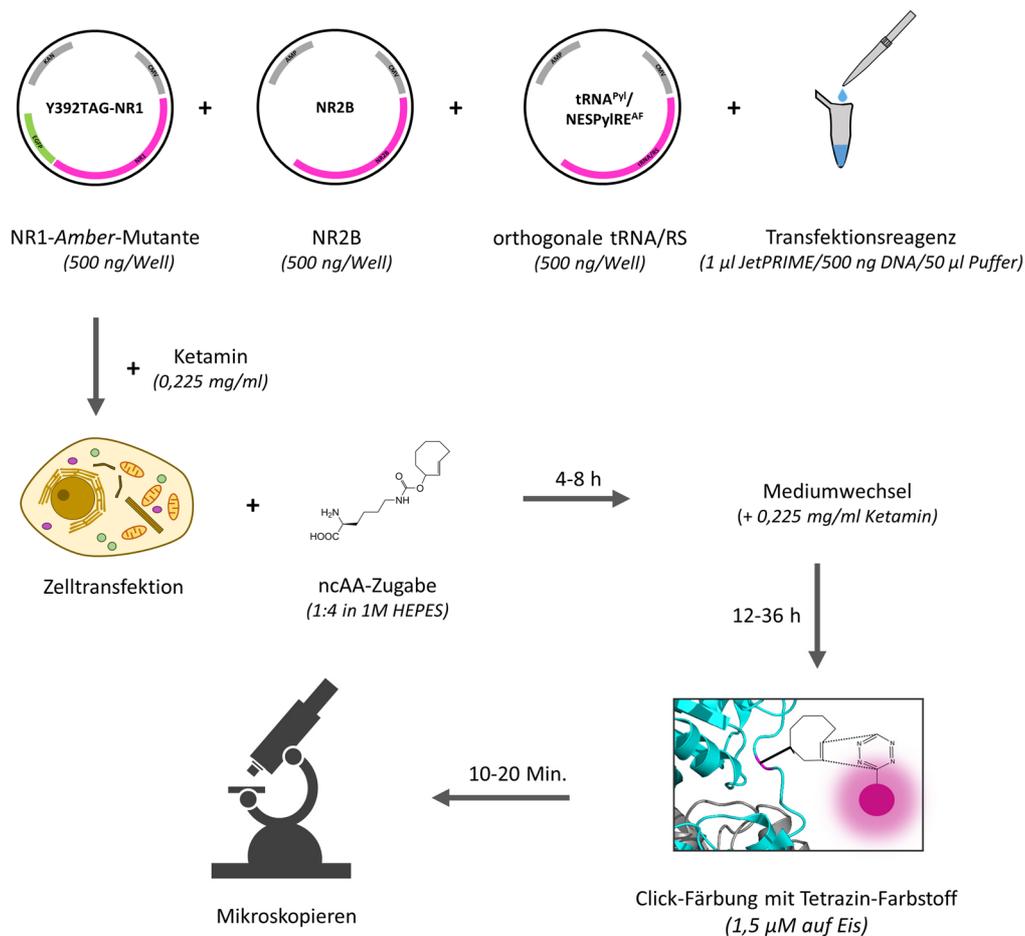


Abbildung 2.1: Ablauf der NMDA-Rezeptor-Zelltransfektion für die bioorthogonale Click-Färbung durch GCE. Vor der Transfektion wurden die Zellen mit Ketamin behandelt, um Kalziumeinströmungen in die Zelle zu verhindern. Alle drei Plasmide (TAG-NR1, NR2B, tRNA^{PyI}/NESPyIRS^{AF}) wurden mit dem Transfektionsreagenz JetPRIME transfiziert. Zusätzlich wurden ncAAs (TCO*A) für 4 – 8 h ins Zellmedium gegeben. Nach einem Mediumwechsel (mit Ketamin) inkubierten die Zellen für 12 – 36 h bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und $5 \text{ } \%$ CO_2 und wurden anschließend mit dem Tetrazin-Click-Farbstoff für 10 – 20 Minuten auf Eis gefärbt und mikroskopiert. Bild der Click-Färbung unten rechts mit Erlaubnis bearbeitet nach Neubert et al. 2018, © 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

2.2.2 Primäre Kulturen von hippocampalen Neuronen

Primäre hippocampale Neuronen wurden von Prof. Dr. med. Christian Geis von der Hans-Berger-Klinik für Neurologie in Jena zur Verfügung gestellt. Die Neuronenkulturen wurden aus Hippocampi von 18 Tage alten Embryonen (E18) von schwangeren C57BL/6 Mäusen (Harlan-Winkelmann) hergestellt. Dazu wurden die Embryonen dekapitiert und deren Köpfe in kaltes HBSS (50 ml 10 x HBSS, 1 ml Pen/Strep, 3,5 ml 1 mM HEPES, ddH₂O auf 500 ml auffüllen – Materialien vom Hersteller Thermo Fisher Scientific) überführt. Das entnommene hippocampale Gewebe wurde in einer 0,25 %-igen Trypsin-EDTA Lösung (Thermo Fisher Scientific) für 15 Minuten bei 37 °C verdaut. Anschließend wurden die Hippocampi zwei Mal mit HBSS gewaschen und in Neurobasal-Kulturmedium (100 ml Neurobasal, 1 % Glutamin, 1 % Pen/Strep, 2 % B27 – Materialien vom Hersteller Thermo Fisher Scientific) überführt. Die Gewebe wurden mit Glaspipetten voneinander getrennt. Schließlich wurden 50 000 Zellen auf einem Ø 18 mm mit 50 µg/ml Poly-D-Lysin beschichteten Deckglas ausgesät, für 14 bzw. 21 Tage kultiviert (DIV14 oder DIV21) und anschließend mit 4 % PFA fixiert.

2.3 Histologie

2.3.1 Silanisierung von Deckgläsern

Damit sich Kryostat-Gehirnschnitte gut auf Deckgläsern färben lassen, wurden diese zuvor silanisiert, um ein Ablösen der Schnitte zu verhindern. Dazu wurden Ø 18 mm runde Präzisions-Deckgläser (Carl Roth GmbH, #LH23.1) mit 1 M KOH (Sigma-Aldrich, #60377) für 15 Minuten im Ultraschallbad gereinigt, zwei Mal mit ddH₂O gewaschen, kurz getrocknet und mit 2 % 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) (Sigma-Aldrich, #A3648) in Methanol für 4 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläser zwei Mal mit ddH₂O gewaschen und über Nacht im Abzug getrocknet.

2.3.2 Kryostatschnitte von murinen Gehirngewebe

Die Maus-Gehirnschnitte wurden freundlicherweise von Dr. Christian Werner vom Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik der Universität Würzburg angefertigt. Hierfür wurden C57BL/6 Mäuse vom Institut für Neurologie der Universität Würzburg mit CO₂ anästhesiert und transkardial mit Heparin in PBS (1000 Einheiten/l in PBS) für 2 Minuten mit Hilfe einer Schlauchpumpe (Ismatec, Wertheim) perfundiert. Anschließend wurden die Mäuse mit 4 % frisch angesetztem kaltem Paraformaldehyd für 12 Minuten fixiert. Unfixierte Gehirnschnitte wurden direkt nach der transkardialen Perfusion mit Isopentan schockgefroren. Mit Hilfe von Scheren und Spateln wurden die Gehirne entnommen und in 50 ml Greiner-Gefäße überführt, um sie über Nacht zu fixieren. Am Folgetag wurden die Gehirne in 30 % Saccharose in PBS gelegt, um sie vor Kälte zu schützen. Gehirne, die auf den Boden des Greiner-Gefäßes absanken, wurden in Tissuetek, umgeben von einem mit Isopentan gefüllten Gefäß, auf Trockeneis schockgefroren und für eine Langzeitlagerung bei – 80 °C eingefroren. 5 – 20 µm Gehirnschnitte wurden auf einem Leica 3050s Kryostat geschnitten. Hierfür wurde die Temperatur für Objekt und Kammer abhängig von der Schnittdicke auf – 19 °C bis – 23 °C eingestellt. Schließlich wurden die Schnitte auf zuvor silanierte Ø 18 mm runde Präzisions-Deckgläser (siehe 2.3.1) positioniert und bei 4 °C gelagert.

2.4 Gewebe- und Zellmarkierung

Die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie ist eine sehr sensitive Methode, in der einzelne Moleküle detektiert werden können. Im Gegensatz zu konventionellen Mikroskopiemethoden ist sie anfälliger gegenüber unspezifischen Hintergrundsignalen und benötigt deshalb besonders sorgfältige Probenvorbereitungen und -färbungen.

2.4.1 Immunfluoreszenzfärbung von primären Neuronen

Für die NMDA-Rezeptor-Immunfärbung wurden PFA fixierte Neuronen (DIV14) nach kurzem Waschen mit PBS (Sigma-Aldrich, #D1408) für 30 Minuten bei RT mit 10 % BSA (Sigma-Aldrich, #A3983) geblockt, um unspezifische Antikörperbindungen zu reduzieren. Alle Antikörperverdünnungen wurden in 10 % BSA durchgeführt (Tabelle 2.7). IgG-Antikörper von Patienten mit Anti-

NMDA-Rezeptor-Enzephalitis (Patienten NR1 AK) wurden freundlicherweise von Prof. Dr. med. Christian Geis von der Hans-Berger-Klinik für Neurologie in Jena zur Verfügung gestellt. Diese wurden aus therapeutischen Plasmapheresematerial durch Trennung mit Austauschchromatographie, wie in Geis et al. 2010 und Sommer et al. 2005, aufgereinigt. Für die Rezeptorfärbung wurde der Primärantikörper 2,5 Stunden (bzw. über Nacht bei 4 °C) inkubiert und anschließend mehrmals mit PBS gewaschen. Nachdem der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper für 2 Stunden bei RT inkubiert wurde, wurde die Probe erneut gewaschen und für 10 Minuten mit 4 % Formaldehyd (Sigma-Aldrich, #F8775) in PBS fixiert und gewaschen. Für die intrazelluläre Homer- oder Bassoon-Färbung wurde die Zellmembran für 10 Minuten mit 0,1 % Triton X-100 (Thermo Fisher Scientific, #28314) permeabilisiert, gewaschen und erneut 30 Minuten mit 10 % BSA bei RT geblockt. Nun wurde der zweite Primärantikörper für 2,5 Stunden (bzw. über Nacht bei 4 °C) zugegeben (Tabelle 2.7). Nach dem Waschen mit PBS wurde schließlich der zweite Sekundärantikörper für 2 Stunden bei RT zugegeben, erneut gewaschen und die Probe für 10 Minuten mit 4 % Formaldehyd und 0,25 % Glutaraldehyd (Sigma-Aldrich, #G5882) fixiert und gewaschen.

2.4.2 Immunfluoreszenzfärbung von Gehirnschnitten

Es stellte sich heraus, dass sich 10 μm unfixierte Mausgehirnschnitte besser für die NMDA-Rezeptorfärbung eignen als fixierte Schnitte. Diese wurden zunächst mit PBS bei RT gewaschen und für 2 Stunden in der Blocklösung (10 % BSA + 5 % Ziegen Serum (Sigma-Aldrich, #G9023) in PBS) geblockt. Alle Wasch- und Inkubationsschritte wurden bei RT unter leichtem Schwenken durchgeführt. Der rekombinante monoklonale NR1-Primärantikörper von diversen Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis-Patienten (freundlicherweise von PD Dr. med. Harald Prüß von der Klinik für Neurologie und experimenteller Neurologie der Charité in Berlin zur Verfügung gestellt) (Kreye et al. 2016) bzw. der kommerzielle anti-NR1-Primärantikörper wurden über Nacht bei 4 °C in der Antikörperlösung (5 % BSA + 5 % Ziegen Serum in PBS) inkubiert und anschließend mehrfach mit PBS gewaschen. Danach wurde der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper in Antikörperlösung für 2 Stunden hinzugegeben (Tabelle 2.7). Nach mehrmaligem Waschen wurde der Schnitt mit 10 % BSA + 5 % Ziegen Serum + 0,3 % Triton X-100 permeabilisiert, um eine darauffolgende intrazelluläre Homer-Färbung über Nacht bei 4 °C in Antikörperlösung durchführen zu können. Nach erneutem mehrmaligem Waschen konnte der zweite Sekundärantikörper für 2 Stunden zugegeben werden, gewaschen und anschließend direkt mikroskopiert werden.

2.4.3 Super-Binde-Peptid-Färbung von Gephyrin

PFA fixierte Neuronen (DIV14 und DIV21) wurden nach kurzem Waschen mit PBS für 10 Minuten mit 0,1 % Triton X-100 bei RT permeabilisiert und anschließend gewaschen. Mögliche unspezifische Bindungen wurden für 30 Minuten mit 5 % BSA und 40 nM 2j-Peptid abgeblockt. Diese Blocklösung wurde ebenfalls für weitere Antikörperverdünnungen verwendet. Der Primärantikörper (anti-VGAT oder anti-VGLUT1) wurde über Nacht bei 4 °C zugegeben, danach mit PBS gewaschen, worauf die Inkubation des fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers für 2 Stunden bei RT folgte (Tabelle 2.7). Die verschiedenen Gephyrin-Peptide (TMR-2i, TMR-2j) wurden in einer Konzentration von 2 nM für 13 Minuten bei RT zugegeben, mit PBS gewaschen und schließlich mit 4 % Formaldehyd und 0,25 % Glutaraldehyd für 10 Minuten bei RT fixiert und gewaschen. Alle Gephyrin-Peptide (TMR-2i, TMR-2j, 2j) wurden freundlicherweise von Dr. Hans M. Maric vom Rudolf-Virchow-Zentrum für experimentelle Biomedizin der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt (Maric et al. 2017).

2.4.4 Bioorthogonale Click-Färbung

Für die spezifische bioorthogonale Click-Färbung der ncAAs wurden transfizierte HEK293T-, COS-7- oder NG108-15-Zellen mit 1,5 μ M Tetrazin-Farbstoffderivaten wie H-tet-Cy5 (Jena Bioscience, #CLK-015-05), H-tet-Cy3 (Jena Bioscience, #CLK-014-05) oder H-tet-ATTO532 (Jena Bioscience, #CLK-011-02) für 10 – 20 Minuten in Zellmedium auf Eis gefärbt (Abbildung 2.1). Alternativ wurden die transfizierten Zellen mit dem Primärantikörper anti-NMDA Receptor 1 (GluN1, Alomone Labs, #AGC-001) in einer Konzentration von 2,6 μ g/ml und mit dem Farbstoff-markierten Sekundärantikörper für jeweils 30 Minuten auf Eis gefärbt (Tabelle 2.7). Nach der Färbung wurden die Zellen kurz mit Zellmedium gewaschen und entweder lebend mikroskopiert oder bei RT für 10 Minuten mit 4 % Formaldehyd und 0,25 % Glutaraldehyd fixiert, mit HBSS (Sigma-Aldrich, #55037C) gewaschen und anschließend mikroskopiert.

Tabelle 2.7: Liste der verwendeten Antikörper

Typ	Antigen	Wirt / Antikörperklasse	Konjugat	Konzentration	Hersteller
Primäre Antikörper	Homer1	Kaninchen IgG (polyklonal)	–	2,5 µg/ml	Synaptic Systems, #160 003
	Bassoon	Maus IgG (monoklonal)	–	5 µg/ml	Enzo Life Science, #ADI-VAM-PS003
	NR1	Maus IgG	–	2,5 µg/ml	BD Bioscience, #556308
	GluN1	Kaninchen IgG	–	2,6 µg/ml	Alomone Labs, #AGC-001
	NR2A/B	Kaninchen IgG	–	2 µg/ml	Merck Millipore, #AB1548
	Patienten NR1	Human IgG	–	10 µg/ml	Prof. Dr. med. C. Geis (Jena)
	007 168 NR1	Human IgG (monoclonal)	–	1-3 µg/ml	Dr. med. H. Prüß (Charité Berlin)
	003 102 NR1	Human IgG (monoclonal)	–	1-3 µg/ml	Dr. med. H. Prüß (Charité Berlin)
	003 109 NR1	Human IgG (monoclonal)	–	1-3 µg/ml	Dr. med. H. Prüß (Charité Berlin)
	Kontroll NR1	Human IgG (monoclonal)	–	1-3 µg/ml	Dr. med. H. Prüß (Charité Berlin)
	VGAT	Meerschweinchen IgG (polyklonal)	–	1:2000	Synaptic Systems, #131 004
	VGLUT1	Kaninchen IgG (polyklonal)	–	0,2 µg/ml	Synaptic Systems, #135 303
	Gephyrin	Maus IgG (monoklonal)	–	5 µg/ml	Synaptic Systems, #147 011
	Sekundäre Antikörper	Kaninchen	Ziege IgG F(ab') ₂	Alexa Fluor 532	10 µg/ml
Kaninchen		Ziege IgG F(ab') ₂	Alexa Fluor 647	10 µg/ml	Thermo Fisher Scientific, #A-21245
Maus		Ziege IgG F(ab') ₂	Alexa Fluor 532	10 µg/ml	Thermo Fisher Scientific, #A-11002
Human		Ziege IgG (H+L)	Alexa Fluor 647	10 µg/ml	Thermo Fisher Scientific, #A-21445
Meerschweinchen		Ziege IgG (H+L)	Alexa Fluor 647	10 µg/ml	Thermo Fisher Scientific, #A-21450

2.5 Elektrophysiologie

Alle Elektrophysiologie-Experimente wurden von PD Dr. Ulrich Terpitz vom Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik an der Universität Würzburg durchgeführt. Hierbei wurde die Patch-Clamp-Methode in der Whole-Cell-Konfiguration angewandt, um den Strom der gesamten Zellmembran von transfizierten NG108-15-Zellen zu messen. Alle Einzelheiten wurden in Neubert et al. 2018 beschrieben. Kurz zusammengefasst, wurde eine Pipette mit einem $1,5 \mu\text{m}$ Durchmesser verwendet und Spannungen von -100 mV bis $+40 \text{ mV}$ angelegt. Die resultierenden Ströme wurden bei 5 kHz Tiefpass-gefiltert und bei einer Samplingrate von 100 kHz mit der Software Clampex 10.6 (Molecular Devices Co.) digitalisiert. Physiologische Lösungen für die elektrophysiologischen Analysen wurden, wie in Tabelle 2.8 beschrieben, hergestellt. Zur Aktivierung des Rezeptors wurde in die Lösung 1 mM frisch angesetztes Natriumglutamat (Merck) mit Hilfe eines Perfusionssystems zugegeben. Um eine Blockierung des NMDA-Rezeptors zu sehen, wurde 1 mM MgCl_2 (Sigma-Aldrich) zugesetzt.

Tabelle 2.8: Lösungen für Whole-Cell Patch-Clamp-Versuche

Lösung	Volumen	Reagenz
Badlösung	140 mM	NaCl (Sigma-Aldrich)
	$2,8 \text{ mM}$	KCl (Merck)
	1 mM	CaCl_2 (Merck)
	10 mM	HEPES (AppliChem)
	$10 \mu\text{M}$	EDTA (Roth)
	$100 \mu\text{M}$	Glycin (SAFC)
	auf 250 ml	ddH_2O
Pipettenlösung	130 mM	CsCl (Roth)
	10 mM	BAPTA (Sigma-Aldrich)
	10 mM	HEPES (AppliChem)
	auf 50 ml	ddH_2O

2.6 Mikroskopie

2.6.1 Konfokale Mikroskopie und FRAP-Experimente

Konfokale Bilder wurden an einem kommerziellen LSM700 Mikroskop (Zeiss) mit einem 63x Immersionsöl-Objektiv und einer Pixelgröße von 90 nm aufgenommen. Ein entsprechender Anregungslaser wurde für jeden spezifischen Farbstoff ausgewählt (488 nm für EGFP, 555 nm für Alexa Fluor 532 und ATTO532, 639 nm für Alexa Fluor 647 und Cy5). Das Pinhole wurde für alle Messungen auf 1 AU (engl. *Airy Unit*) gesetzt. Alle Farben wurden linear auf Helligkeit und Kontrast eingestellt, wobei bei einem Intensitätsvergleich verschiedener Proben stets identische Einstellungen gewählt wurden.

Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP) Experimente wurden durchgeführt, um die Mobilität der NMDA-Rezeptoren in transfizierten und H-tet-Cy5 geklickten HEK293T-Zellen zu analysieren. FRAP-Messungen wurden auf demselben Mikroskop durchgeführt und mit der ZEN Blue Edition Software von Zeiss ausgewertet. Für jeden FRAP-Versuch wurde ein Startbild aufgenommen und drei verschiedene Regionen definiert: Region 1 wurde mit der maximalen Laserintensität der entsprechenden Wellenlänge gebleicht, Region 2 wurde als Referenz festgelegt und nicht gebleicht, in Region 3 wurde das Hintergrundsignal gemessen. Anschließend wurde das Experiment gestartet, wobei die festgelegte Region 1 gebleicht wurde und 100 Bilder (256 x 256 Pixel) bei einem 300 ms Intervall aufgenommen wurden. Folgende monoexponentielle Kurve

$$S(t) = S_i - (S_f - S_0) * \exp(-t/t_{rel})$$

wurde an das Mittelwertsignal der Region $S(t)$ angefügt. Dieses startet am anfänglichen Signal S_i vor dem Bleichen, bis hin zu S_0 nach dem Bleichen und nähert sich dem finalen Signal S_f . Mit Hilfe der charakteristischen Relaxationszeit t_{rel} konnte die Halbwertszeit $t_{1/2} = t_{rel} * \ln(2)$ der Fluoreszenz-Wiederherstellung berechnet werden. Der mobile Anteil wurde durch $(S_f - S_0) / (S_i - S_0)$ ermittelt.

2.6.2 Structured Illumination Microscopy (SIM)

Strukturierte Beleuchtungsmikroskopie- (engl. *structured illumination microscopy*, SIM) Bilder wurden an einem kommerziellen inversen ELYRA S.1 Mikroskop (Zeiss) aufgenommen und prozessiert. Das SIM ist mit einem 63x/1.4 Immersionsöl-Objektiv (DIC M27), einer sCMOS- (engl. *scientific complementary metal-oxide-semiconductor*) Kamera und vier verschiedenen Anregungslasern ausgestattet. In dieser Arbeit wurden die Laser 643 nm und 568 nm verwendet, um die Farbstoffe Alexa Fluor 647, TMR und Alexa Fluor 532 anzuregen. Dabei wurde eine Laserintensität je nach Experiment zwischen 5 – 10 % gewählt. Üblicherweise wurden die Bilder mit einer strukturierten Beleuchtung durch fünf Rotationsvariationen und fünf Phasenverschiebungsvariationen aufgenommen. Mit der ZEN Black Edition Software (Zeiss) wurden die Bilder prozessiert und das Channel Aligement durchgeführt.

2.6.3 dSTORM

Setup

Alle dSTORM-Aufnahmen wurden an einem schwingungsgedämpften inversen Weitfeldmikroskop (IX-71, Olympus) aufgenommen. Für die Anregung von Alexa Fluor 647 und Cy5 wurde der 641 nm Diodenlaser (Cube 640-100C, Coherent) verwendet, für die Anregung von Alexa Fluor 532 der 532 nm Laser (Nano250, Linos). Um eine gute Anregung der Fluorophore zu erreichen, wurden verschiedene optische Bauteile (Spiegel, Linsen, Strahlteiler und Filter) in das Mikroskop verbaut. Der Laserstrahl wurde auf die hintere Fokalebene des 60x Immersionsöl-Objektivs (NA 1.45, Olympus) fokussiert, um die Probe parallel zu beleuchten. Das Objektiv mit Probe kann über eine Nosepiece-Stage (IX2-NPS, Olympus) vom Probenstisch entkoppelt werden, um Drift zu minimieren. Anregungs- und Emissionslicht wurden durch einen dichroitischen Spiegel (635rpc, Chroma) getrennt, durch einen Bandpassfilter (Em01-R442/514/647-25, Semrock) spektral gefiltert und auf eine hochsensitive EMCCD Kamera (Ixon DU 897, Andor) projiziert. Durch weitere Linsen im Detektionsarm wurde eine endgültige Pixelgröße von 128 nm für den roten Kanal und 131 nm für den grünen Kanal erreicht. Basale Membranen von transfizierten HEK293T-Zellen wurden im TIRF-Beleuchtungsmodus aufgenommen, äquatoriale HEK293T Zellmembranen im EPI-Modus und Neuronen sowie Gehirnschnitte im HILO-Modus gemessen. Für jede dSTORM-Aufnahme wurden 15 000 – 30 000 Bilder mit einer Belichtungszeit von 20 ms

und einer Strahlungsintensität von ca. 5 kW/cm² aufgenommen. Dabei wurde eine Pixelgröße von 512 x 512 Pixel gewählt.

Zwei-Farben *d*STORM

Um NMDA-Rezeptoren zusammen mit dem Synapsenmarker Homer mittels Zwei-Farben *d*STORM messen zu können, mussten beide Spektren voneinander getrennt aufgenommen werden. Hierfür wurden roter und grüner Kanal sequenziell aufgenommen, indem zwei verschiedene Detektionsarme und Kameras verwendet und anschließend beide Signale aufeinander aligniert wurden. Durch chromatische Aberration kommt es gelegentlich zu einer leichten Verschiebung der Bildposition, weshalb vor jeder Zwei-Farben-Messung die Kameraposition auf den jeweiligen Farbstoff ausgerichtet wurde. Um Photobleichen zu verhindern, wurde das Fluorophor mit der längeren Wellenlänge (roter Farbstoff) zuerst gemessen und dasjenige mit der kürzeren Wellenlänge (grüner Farbstoff) direkt im Anschluss. Zwischen der Aufnahme beider Farben durfte der Fokus nicht verändert werden, da sonst beide Bilder nicht aufeinander aligniert werden können. Um im Nachhinein beide Farben mit Hilfe einer Bildregistrierung durch das Fiji-Plugin bUnwarpJ übereinander legen zu können, wurden vor und nach der Messung Kalibrationsbilder mit TetraSpecks (Thermo Fisher Scientific, #T14792) mit den verwendeten Laserlinien aufgenommen.

Schaltpuffer

Um das Photoschalten der verschiedenen Farbstoffe bei *d*STORM-Aufnahmen gewährleisten zu können, müssen diese in thiolhaltigen PBS-basierten Puffer inkubieren. Dieser besteht aus 100 mM β -Mercaptoethylamin (MEA, Sigma-Aldrich, #M6500) in PBS. Der pH-Wert ist Fluorophor-abhängig und wurde mit 5M KOH zwischen 7,4 – 8,0 eingestellt.

2.6.4 Bildrekonstruktion und -auswertung

rapidSTORM

Alle *d*STORM-Aufnahmen wurden mit Hilfe einer frei verfügbaren Lokalisationssoftware rapidSTORM 3.3, die in Wolter et al. beschrieben ist, rekonstruiert (Wolter et al. 2010; Wolter et al. 2012). Kurz zusammengefasst, lokalisiert die Software die Intensitäten und Positionen der einzelnen Fluorophore mit Nanometerpräzision, indem eine zweidimensionale Gauß-Funktion an deren PSF angepasst wird. Alle angepassten emittierten Lokalisationen werden von der Software als Tabelle abgespeichert sowie zu einem rekonstruierten hochaufgelösten Bild aufsummiert. Zudem stellt rapidSTORM verschiedene Parameter für die Datenverarbeitung zur Verfügung. So kann mit Hilfe der Software beispielsweise ein Setupdrift erkannt und korrigiert werden. Zusätzlich lassen sich Parameter wie Pixelgröße, PSF FWHM, minimaler Intensitäts-Threshold, lineare Driftkorrektur, Molekültracking und vieles mehr bestimmen. Die Rohdaten waren typischerweise 512 x 512 Pixel große Dateien mit 15 000 – 30 000 Einzelbildern. Lokalisationen, die weniger als 1000 Photonen aufwiesen, wurden typischerweise verworfen, um sie von Hintergrundrauschen und Falsch-Lokalisationen unterscheiden zu können. Das rekonstruierte Bild wurde schließlich mit einer Pixelgröße von 10 nm in X- und Y-Richtung generiert. Alle Lokalisationen, Positionen, Intensitäten und Bildnummern wurden in einer einzigen Textdatei (Lokalisationsdatei) gespeichert und für weitere Analysen genutzt. In dieser Arbeit wurden die Lokalisationsdateien von Homer- und NR1-Färbungen in Gehirnschnitten für weitere Clusteranalysen mit Hilfe einer Python-Bibliothek verwendet.

Fiji

Fiji (Fiji is Just ImageJ) ist ein Open-Source-Softwareprogramm für Bildverarbeitung mit zusätzlichen Plugins für wissenschaftliche Bildanalysen (Schindelin et al. 2012). In dieser Arbeit wurde es vor allem für die Bildbearbeitungsprozesse wie Kontrasteinstellungen, Normalisierungen, Bildformate, Anpassung von Pixelgrößen, Maßstabsbalken, Farbanpassung und Kanalanpassungen verwendet. Um eine Überlagerung zweier spektraler Fluoreszenzkanäle von Zwei-Farben *d*STORM zu ermöglichen, wurde eine Transformationsmatrix mit Hilfe des Fiji-Plugins bUnwarpJ erstellt. Der bUnwarpJ-Algorithmus ermöglicht eine elastische Bildanpassung von zwei Bilddateien. Dazu wurden die TetraSpeck-Bilder von rotem und grünem Kanal im Programm geöffnet und Referenzpunkte (sog. Landmarks) auf verschiedene TetraSpeck-Signale beider Farben gesetzt. Während der

Registrierung erzeugt bUnwarpJ eine elastische Transformationsmatrix und kalkuliert die Verzerrung zwischen beiden Bildern. Diese Transformationsmatrix kann in die rapidSTORM-Software eingelesen werden, um die dSTORM-Daten zu alignieren. bUnwarpJ wird näher beschrieben auf <https://imagej.net/BUnwarpJ>.

Imaris

Kolokalisationsanalysen des Gephyrin-Peptids wurden mit prozessierten SIM-Daten mit Hilfe der kommerziellen Software Imaris (Bitplane AG, Oxford Instruments) durchgeführt. Hierfür wurden die Bilder so zugeschnitten, dass nur die einzelnen Neuronenkompartimente sichtbar waren, ohne dass der Nukleus der Zelle mit einbezogen wurde. Der Threshold beider Farbkanäle wurde auf 10 000 für den grünen Kanal und 20 000 für den roten Kanal gewählt. Die Kolokalisation wurde anschließend ermittelt, indem das Verhältnis zwischen der Anzahl der kolokalisierten Pixel und der Anzahl aller Pixel über dem Threshold (bezeichnet als Volumen in Imaris) berechnet wurde (Maric et al. 2017).

Origin Pro

Origin Pro ist eine kommerziell erhältliche Software zur Datenverarbeitung und -darstellung und wurde für die Grafikdarstellungen der Kolokalisationsdaten aus Imaris und Auswertung der Patch-Clamp-Rohdaten verwendet.

Python

Lokalisationen der dSTORM-Rohdaten von Homer und NR1 in Gehirnschnitten wurden mit einer individuell geschriebenen Python-Bibliothek, erstellt von PD Dr. Sören Dose vom Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik der Universität Würzburg, analysiert. Zunächst wurde die Lokalisationspräzision beider Signale bestimmt. Um räumlich zusammenhängende Lokalisationen zu Clustern zusammenzufassen, wurde ein DBSCAN- (engl. *density-based spatial clustering of applications with noise*) Algorithmus mit zwei Parametern, einem Abstand r zwischen Nachbarpunkten und einer Mindestanzahl an Nachbarn minPts , verwendet. Für die Charakterisierung der postsynaptischen Homer-Signale wurde der Abstand zwischen Nachbarpunkten $r = 40$ nm und die Mindestanzahl an Nachbarn $\text{minPts} = 20$ gesetzt. Für die Charakterisierung der NR1-Cluster wurde dagegen $r = 16$ nm und $\text{minPts} = 4$ gesetzt. Es wurden nur Homer-Cluster mit einer Größe ab $50\,000\text{ nm}^2$ analysiert. Anschließend konnten NR1-Lokalisationen

innerhalb oder außerhalb der definierten Homer-Cluster bestimmt werden. Alle NR1-Lokalisationen innerhalb des Homer-Clusters wurden als synaptische Rezeptoren und alle NR1-Lokalisationen in einem Abstand von bis zu 1000 nm als extrasynaptisch definiert.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Markierung des NMDA-Rezeptors durch Antikörperfärbung

Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis ist eine kürzlich entdeckte Autoimmunerkrankung im Gehirn, bei der die Patienten sog. Autoantikörper gegen die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors bilden. Dies führt wahrscheinlich zu einer Autoantikörper-vermittelten Internalisierung des Rezeptors und somit zu dessen reversiblen Verlust auf der postsynaptischen Membran (Dalmau et al. 2008; Dalmau et al. 2019). Patienten mit dieser Erkrankung weisen ein mehrstufiges Krankheitsbild mit psychiatrischen und neurologischen Störungen auf. Da die Dichte der NMDA-Rezeptoren im Bereich des Hippocampus besonders erhöht ist, führt die Erkrankung oft zu Gedächtnisstörungen, Psychosen und Schizophrenie, ebenso zu motorischen Störungen im späteren Krankheitsverlauf, wie Herzrhythmusstörungen und Hyperventilation, bis hin zum Tod (Florance et al. 2009; Dalmau et al. 2008). Sowohl die Ursache der Autoantikörperbildung als auch der genaue Mechanismus der NMDA-Rezeptorinternalisierung sind noch nicht geklärt. In dieser Arbeit wurden verschiedene Markierungsmethoden getestet, um NMDA-Rezeptoren möglichst spezifisch anzufärben und hochaufgelöst sichtbar zu machen. Dies ist für zukünftige Forschungsexperimente, die auf spezifische Färbemethoden aufbauen, notwendig, um somit möglichst bald die Ursache dieser Erkrankung herausfinden zu können. In diesem Kapitel wurde der NMDA-Rezeptor sowohl in Neuronen als auch in Gehirnschnitten zunächst mit Hilfe von klassischer Antikörperfärbung sichtbar gemacht.

3.1.1 Homer- und Bassoon-Färbung

Um NMDA-Rezeptoren auf der Postsynapse sowohl in Neuronen als auch in Gehirnschnitten genau identifizieren und lokalisieren zu können, wurden diese zusammen mit den prä- und postsynaptischen Strukturproteinen Bassoon und Homer angefärbt. Dazu wurden zunächst vorexperimentelle neuronale Kofärbungen der Markerproteine Bassoon und Homer in der aktiven Zone von Prä- und Postsynapse durchgeführt, um herauszufinden, ob wir in der Lage sind beide synaptischen Strukturproteine getrennt voneinander aufzulösen. Hierfür wurden fixierte primäre Mausneuronen (DIV14) permeabilisiert und mit primären und sekundären Antikörpern gegen Bassoon und Homer angefärbt und mit Konfokalmikroskopie- bzw. hochauflösender *d*STORM-Messung betrachtet und verglichen. Zwei-Farben *d*STORM ist sehr von der Photophysik der einzelnen Fluorophore abhängig, da die Lokalisationspräzision indirekt proportional zur Quadratwurzel der Anzahl der detektierten Photonen im AN-Zustand ist. Es stellte sich heraus, dass die bestmögliche Fluorophor-Kombination für Zwei-Farben *d*STORM Alexa Fluor 647 mit Alexa Fluor 532 ist. Beide Farben wurden sequentiell mit zwei verschiedenen Kameras aufgenommen. Mit Hilfe einer geeigneten Filterkombination wurden beide Farbstoffspektren komplett voneinander getrennt und nacheinander gemessen. Dabei wurde stets zuerst der langwellige rote Kanal und anschließend der kurzwellige grüne Kanal aufgenommen, um ein Photobleichen zu verhindern. Durch chromatische Aberration im Mikroskop und geringen Unterschieden im Detektionsarm kann es zu leichten Verschiebungen beider Farben kommen. Deshalb ist das Alignment der zwei Farben im Nachhinein von enormer Bedeutung. Mit Hilfe von kleinen Kügelchen, die verschiedene Fluorophore tragen (TetraSpecks von Invitrogen), wurden vor und nach der Messung jeweils mehrere Kalibrationsbilder auf beiden Kameras aufgenommen und diese anschließend für das Alignment mit Hilfe einer Bildregistrierung verwendet. Die Bildregistrierung wurde mit dem Fiji-Plugin bUnwarpJ durchgeführt. Dabei wurde eine elastische Transformation in Form eines Vektorfeldes über die Kalibrationsprobe erstellt und anschließend auf jedes *d*STORM-Bild übertragen. Die Präzision des Alignments wird in Abbildung 3.1 gezeigt. Es muss jedoch beachtet werden, dass während der gesamten Messung keine Drifterscheinungen auftreten, was sich nicht nur negativ auf das Alignment auswirken kann, sondern ebenso auf die Zwei-Farben-Rekonstruktion beider Strukturen.



Abbildung 3.1: Zwei-Farben *d*STORM Kalibration mit TetraSpecks. Für Zwei-Farben *d*STORM wurden beide Farben sequentiell aufgenommen und im Nachhinein mit Hilfe einer Bildregistrierung aligniert. Dazu wurden Kalibrationsproben mit TetraSpecks mit beiden Kameras aufgenommen. Ohne eine Bildregistrierung der TetraSpecks besteht ein deutlicher Versatz zwischen rotem und grünem Kanal (links). Nachdem beide Kanäle mit Hilfe des Fiji-Plugins bUnwarpJ durch eine elastische Transformation, basierend auf einem Vektorfeld (Mitte), aligniert wurden, überlagern rote und grüne Fluorophore der TetraSpecks (rechts). Der Maßstabsbalken entspricht $0,5 \mu\text{m}$.

Die Ergebnisse der Homer-Bassoon-Färbung zeigten auf Konfokalebene eine Kollokalisierung beider synaptischer Proteine (Abbildung 3.2 A). In den rekonstruierten hochauflösten *d*STORM-Bildern konnte hingegen zwischen Prä- und Postsynapse unterschieden werden (Abbildung 3.2 B). Je nach Orientierung der Synapsen war die Balken-ähnliche Struktur beider Synapsenproteine gegenüber voneinander, also auf Prä- und Postsynapse, erkennbar (Frontalansicht). Beide wurden durch den $10 - 20 \text{ nm}$ großen synaptischen Spalt voneinander getrennt. Wurden die Synapsen allerdings von der Seitenansicht betrachtet, war der synaptische Spalt nicht mehr erkennbar. Mit diesen Messungen konnte gezeigt werden, dass aufgrund der erhöhten Auflösung von *d*STORM zwischen Prä- und Postsynapse unterschieden werden konnte. Dagegen konnte die herkömmliche Konfokalmikroskopie Prä- und Postsynapse nicht getrennt auflösen. Die Ergebnisse zeigten außerdem, dass die Antikörper gegen Bassoon und Homer gut geeignet sind, um die Postsynapse für weitere Experimente lokalisieren zu können.

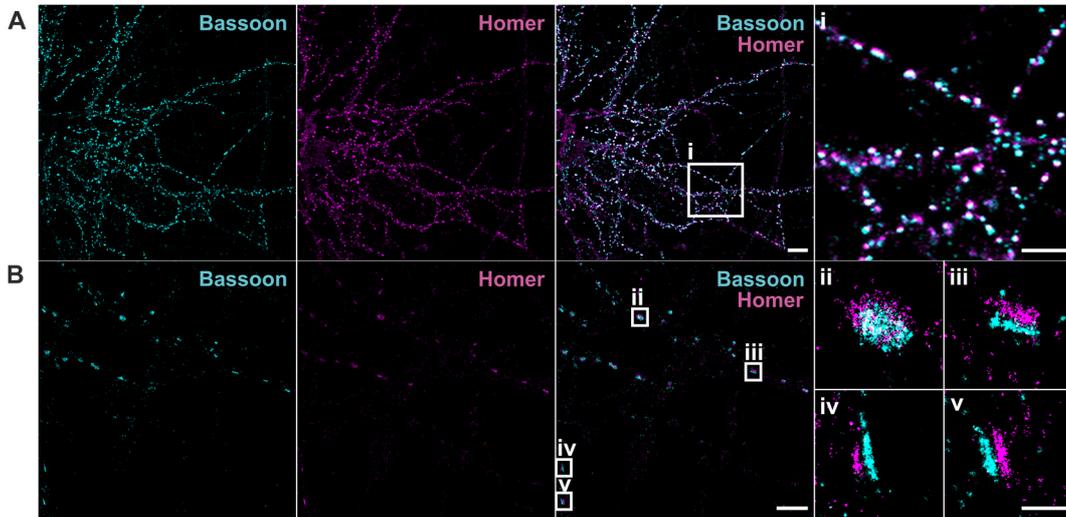


Abbildung 3.2: Bassoon- und Homer-Färbung primärer Neuronen. Antikörperfärbung fixierter primärer Mausneuronen (DIV14) mit den prä- und postsynaptischen Markerproteinen Bassoon (Alexa Fluor 532 gekoppelter Sekundärantikörper, cyan) und Homer (Alexa Fluor 647 gekoppelter Sekundärantikörper, magenta), mikroskopiert mit Konfokalmikroskopie (A) und *d*STORM (B). Erst in den hochauflösenden *d*STORM-Bildern konnte zwischen Prä- und Postsynapse unterschieden werden. Je nach Orientierung der Synapse erkennt man die Balken-ähnliche Struktur von Bassoon und Homer, separiert durch den synaptischen Spalt (Fronatalansicht in iii-v) oder übereinander (Seitenansicht in ii). Maßstabsbalken entsprechen in (A) 10 μm bzw. 5 μm in i und in (B) 2,5 μm bzw. 0,5 μm in ii-v.

3.1.2 NMDA-Rezeptor-Färbung in primären Neuronen

Der NMDA-Rezeptor ist ein ionotroper Glutamaterezeptor, der auf der postsynaptischen Membran, insbesondere von hippocampalen Neuronen, lokalisiert ist. Er ist ein Heterotetramer, der aus zwei obligatorischen NR1-Untereinheiten und zwei NR2- bzw. NR3-Untereinheiten besteht. Die am häufigsten vorkommenden NMDA-Rezeptoren bestehen aus zwei NR1-Untereinheiten und zwei NR2-Untereinheiten. Dabei besteht NR2 meist aus den Splicevarianten NR2A bzw. NR2B. Die Splicevarianten NR2C und NR2D sind dagegen seltener anzutreffen (Flores-Soto et al. 2012). In dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt auf die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors gesetzt, da diese von Autoantikörpern während der Autoimmunerkrankung Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis gebunden wird. In den ersten Experimenten wurde die NR1-Untereinheit durch indirekte Antikörperfärbung in fixierten primären Mausneuronen (DIV14) markiert. Die Antikörperfärbung und -spezifität wurde zunächst durch Konfokalmikroskopie

geprüft (Abbildung 3.3). Um die Postsynapse lokalisieren zu können, wurde zusätzlich das Strukturprotein Homer markiert. Die ersten Kofärbungen zeigten keinerlei Kolo-kalisation von Homer und NR1, gefärbt mit einem kommerziell erhältlichen anti-NR1-Antikörper (BD Bioscience), ebenso nicht mit einem aufgereinigten IgG-Antikörper, isoliert von einem Patienten mit Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis (Patienten AK) (freundlicherweise von Prof. Dr. med. Christian Geis von der Hans-Berger-Klinik für Neurologie in Jena zur Verfügung gestellt). Möglicherweise bindet der kommerzielle NR1-Antikörper sehr unspezifisch, da fast keine NR1-Markierungen auf der Postsynapse identifiziert wurden. Es ist zwar bekannt, dass einige NMDA-Rezeptoren ebenso im extrasynaptischen Bereich lokalisiert sind (Petralia 2012), was jedoch nicht ausschließt, dass sich trotzdem ein Großteil der NMDA-Rezeptoren in der Postsynapse befindet. Der Patientenantikörper wies eine ähnliche Färbung auf. Dessen Aufreinigung erfolgte aus dem Plasmapheresematerial eines Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis-Patienten, indem alle IgG-Antikörper aus dessen Plasma isoliert wurden. Somit wurde mit einer polyklonalen IgG-Fraktion gefärbt. Möglicherweise hatte der Patient einen relativ geringen NR1-Autoantikörpertiter im Verhältnis zum Gesamt-IgG-Pool, sodass NR1 kaum angefärbt werden konnte. Daraufhin wurde ein rekombinanter monoklonaler NR1-Patientenantikörper (003 102 NR1 mAK) getestet. Dieser wurde von PD Dr. med. Harald Prüb und seiner Gruppe von der Klinik für Neurologie und experimenteller Neurologie der Charité in Berlin hergestellt, indem das monoklonale Antikörperrepertoire von B-Gedächtniszellen und Antikörper-sekretierenden Zellen aus dem Liquor verschiedener Patienten mit Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis charakterisiert wurde. Anschließend wurden verschiedene rekombinante monoklonale NR1-Patientenantikörper in transfizierten HEK293T-Zellen hergestellt (Kreye et al. 2016). In unseren Experimenten wies der 003 102 monoklonale NR1-Patientenantikörper eine gute NR1-Färbung auf und kolo-kalisierte mit Homer. Dagegen zeigte der monoklonale rekombinante Kontroll-Antikörper (Kontroll mAK) keinerlei Färbung und somit keine Kolo-kalisation mit Homer. Dieser stammte aus dem Liquor von einem Kontroll-Patient ohne neuroimmunologische Erkrankungen und wies keinerlei Reaktivität gegen neurologisches Gewebe auf.

Außerdem wurden neuronale Kolo-kalisationsfärbungen mit dem präsynaptischen Markerprotein Bassoon und dem kommerziellen anti-NR2A/B-Antikörper durchgeführt (Abbildung 3.4). Letzterer zeigte in Konfokalaufnahmen eine solide Färbung, sowohl innerhalb als auch außerhalb der Synapse. Da durch die schlechtere Auflösung der Konfokalmikroskopie nicht zwischen Prä- und Postsynapse unterschieden werden kann, ist hier eine Kolo-kalisation von NR2 und Bassoon

erkennbar. Darüber hinaus konnte ebenfalls eine Kolo­kalisierung des rekombinan­ten monoklonalen NR1-Patientenantikörper 003 102 (003 102 NR1 mAK) mit Bassoon festgestellt werden (Abbildung 3.4).

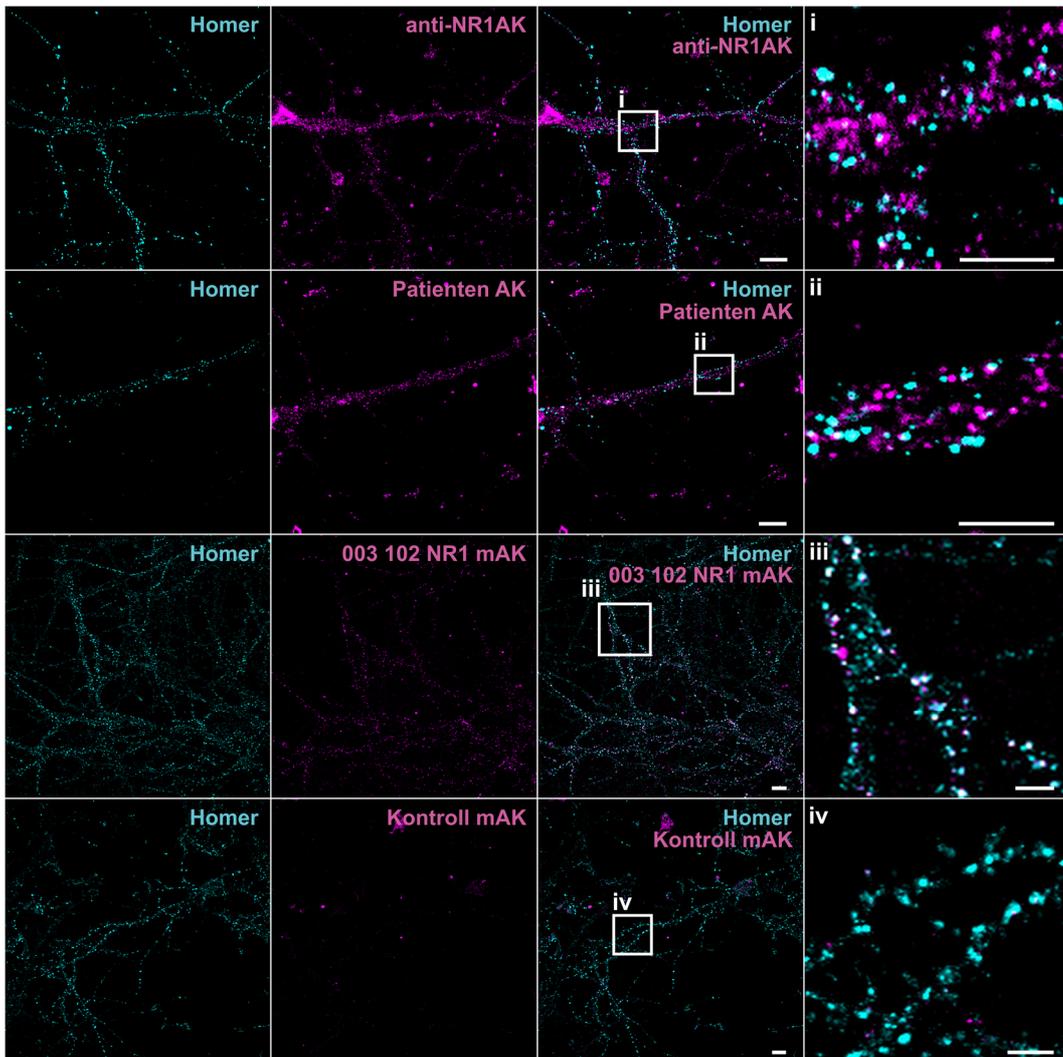


Abbildung 3.3: Neuronale Homer- und NR1-Färbungen. Fixierte primäre hippocampale Mausneuronen (DIV14) wurden mit dem postsynaptischen Strukturprotein Homer (Alexa Fluor 532 gekoppelter Sekundärantikörper, cyan) und verschiedenen Antikörpern gegen die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors (Alexa Fluor 647 gekoppelter Sekundärantikörper, magenta) gefärbt: kommerzieller anti-NR1-Antikörper (anti-NR1 AK), IgG-Antikörper von einem Patient mit Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis (Patienten AK), rekombinanter monoklonaler NR1-Patientenantikörper (003 102 NR1 mAK), rekombinanter monoklonaler Kontroll-Antikörper aus einem gesunden Probanden (Kontroll mAK) (von oben nach unten). Konfokalmikroskopie-Aufnahmen mit Maßstabsbalken 10 μm , bzw. 5 μm in i-iv.

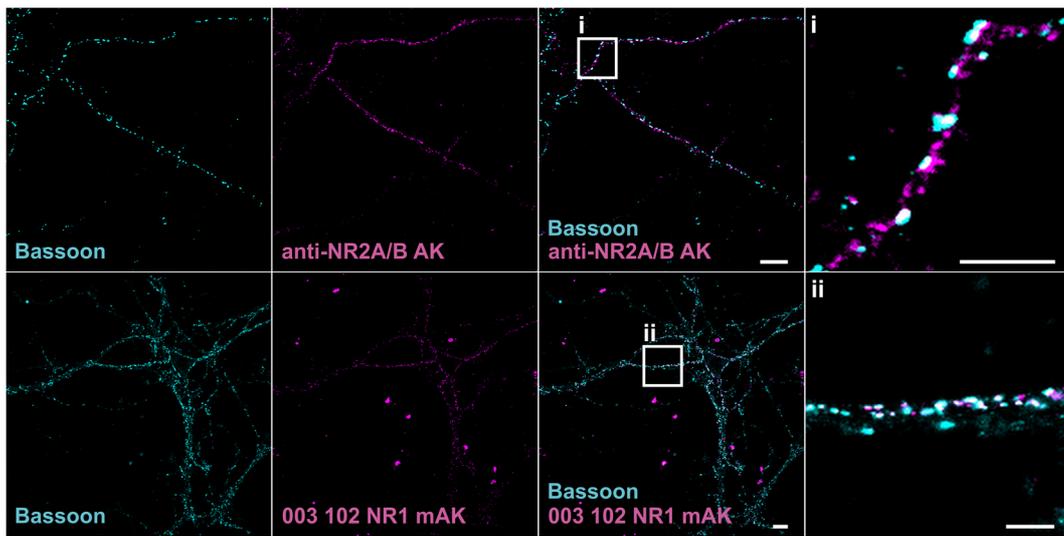


Abbildung 3.4: Neuronale Färbungen von Bassoon und dem NMDA-Rezeptor. Fixierte primäre hippocampale Mausneuronen (DIV14) wurden mit dem präsynaptischen Strukturprotein Bassoon (Sekundärantikörper gekoppelt an Alexa Fluor 532, cyan) markiert. Zusätzlich wurde mit einem kommerziellen anti-NR2A/B-Antikörper (anti-NR2A/B AK, oben) bzw. mit dem rekombinanten monoklonalen NR1-Patientenantikörper (003 102 NR1 mAK, unten) angefärbt (jeweils Alexa Fluor 647 gekoppelter Sekundärantikörper). Konfokalmikroskopie-Aufnahmen mit Maßstabsbalken 10 μm , bzw. 5 μm in i-ii.

Um eine deutlich bessere Auflösung des NMDA-Rezeptors innerhalb der Synapsen zu erlangen, wurden schließlich Zwei-Farben *d*STORM-Aufnahmen von fixierten primären Neuronen (DIV14) durchgeführt. Dazu wurde Homer und die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors mit verschiedenen NR1-Antikörpern auf der Postsynapse angefärbt. Für die Zwei-Farben *d*STORM-Aufnahmen wurden erneut die Sekundärantikörper-Fluorophore Alexa Fluor 647 und Alexa Fluor 532 verwendet. Wie in 2.6.3 beschrieben, wurde zuerst der rote Kanal und anschließend der grüne Kanal mit zwei verschiedenen Kameras sequentiell aufgenommen. Für ein gutes Photoblinken der einzelnen Farbstoffe wurde ein PBS-basierter Probenpuffer verwendet, der 100 mM β -Mercaptoethylamin (MEA) enthielt und einen pH-Wert von 7,4 – 8,0 aufwies. Um weniger Hintergrundsignal zu erhalten, wurden alle Aufnahmen im HILO-Modus aufgenommen und schließlich mit der rapidSTORM-Software rekonstruiert und mit dem Fiji-Plugin bUnwarpJ aligniert. Diesmal wurde der kommerzielle anti-NR1-Antikörper (anti-NR1 AK), im Gegensatz zu allen anderen Färbungen, mit einem Alexa Fluor 532 gekoppelten Sekundärantikörper und Homer mit einem Alexa Fluor 647 gekoppelten Sekundärantikörper angefärbt, in der Hoffnung eine bessere Färbung zu erzielen. Jedoch konnte der kommerzielle NR1-Antikörper in

den rekonstruierten hochaufgelösten *d*STORM-Bildern erneut kein Signal liefern, sowohl innerhalb als auch außerhalb der Synapse (Abbildung 3.5). Dagegen erwies sich ein weiterer rekombinanter monoklonaler Patientenantikörper 007 168 NR1 mAK, der ebenso freundlicherweise von PD Dr. med. Harald Prüß (von der Klinik für Neurologie und experimenteller Neurologie der Charité in Berlin) zur Verfügung gestellt wurde, als sehr spezifisch. 007 168 NR1 mAK zeigte einzelne Lokalisationen innerhalb des dicht gepackten Homer-Signals und ist damit in der Postsynapse lokalisiert. Einige wenige 007 168 NR1 mAK-Signale wurden ebenso außerhalb der Synapse lokalisiert. Der rekombinante monoklonale Kontroll-Antikörper aus einem gesunden Probanden (Kontroll mAK) zeigte stattdessen keine Färbung, ähnlich dem Signal des kommerziellen anti-NR1-Antikörpers. Zusätzlich wurde Bassoon mit dem kommerziellen anti-NR2A/B-Antikörper kogefärbt, wobei eine schwache NR2-Färbung erkennbar war. Hier schien der kommerzielle Antikörper ebenfalls ineffizient zu binden.

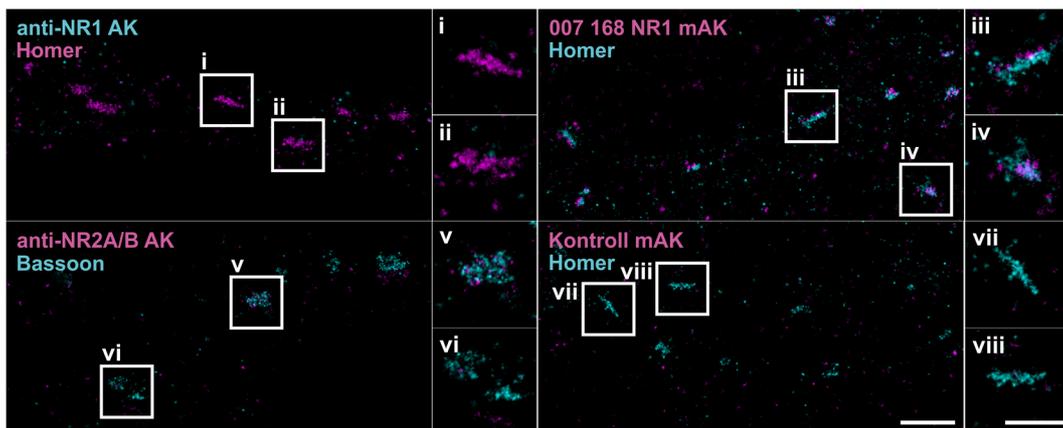


Abbildung 3.5: Hochaufgelöste NMDA-Rezeptoren in Synapsen von primären Neuronen. Fixierte primäre hippocampale Mausneuronen (DIV14) wurden mit dem postsynaptischen Strukturprotein Homer (Alexa Fluor 532 gekoppelter Sekundärantikörper, cyan; bzw. oben links: Alexa Fluor 647 gekoppelter Sekundärantikörper, magenta) oder mit dem präsynaptischen Markerprotein Bassoon (Alexa Fluor 532 gekoppelter Sekundärantikörper, cyan; unten links) angefärbt. Diese wurden kogefärbt mit dem kommerziellen anti-NR1-Antikörper (anti-NR1 AK; Alexa Fluor 532 gekoppelter Sekundärantikörper, cyan), kommerziellen anti-NR2A/B-Antikörper (anti-NR2A/B AK; Alexa Fluor 647 gekoppelter Sekundärantikörper, magenta), rekombinanten monoklonalen NR1-Patientenantikörper (007 168 NR1 mAK; Alexa Fluor 647 gekoppelter Sekundärantikörper, magenta) oder dem monoklonalen rekombinanten Kontroll-Antikörper (Kontroll mAK; Alexa Fluor 647 gekoppelter Sekundärantikörper, magenta). *d*STORM-Aufnahmen mit Maßstabsbalken 2,5 μm bzw. 0,5 μm in i-viii.

In den neuronalen Färbungen konnte gezeigt werden, dass kommerzielle Antikörper, sowohl gegen die NR1-Untereinheit als auch gegen die NR2-Untereinheit des NMDA-Rezeptors, nicht spezifisch binden. Dabei lieferte der kommerzielle NR2A/B-Antikörper etwas bessere Ergebnisse als der kommerzielle NR1-Antikörper. Dies ließ sich sowohl auf Konfokalmikroskopie-Ebene als auch mit *d*STORM zeigen. Es wurde außerdem ein weiterer kommerzieller NR1-Antikörper (Anti-NMDAR1 Antikörper, Merck Millipore; #MAB363) getestet, der allerdings gleich ineffiziente Färbungen zeigte (hier nicht gezeigt). Ein Grund für die Unspezifität könnte die Epitoperkennung dieser kommerziellen Antikörper sein. Die meisten kommerziellen NR1-Antikörper binden innerhalb der Ligand-Binde-Domäne (LBD) und der transmembranen Domäne (TMD) der NR1-Untereinheit im Bereich der Aminosäuren 660 bis 811 (u.a. die kommerziellen NR1-Antikörper von BD Bioscience und Millipore), was einen sehr großen Epitopbereich darstellt (Abbildung 3.6). Wahrscheinlich sind diese Epitope schlecht zugänglich für Antikörper, was die schwache kommerzielle Antikörperfärbung erklären könnte. Da die extrazelluläre Rezeptorfärbung vor der Permeabilisierung der Neuronen durchgeführt wurde, ist es möglich, dass die NR1-Antikörper ihr Epitop nur schlecht erreicht und gebunden haben könnten. Ebenso konnten isolierte polyklonale IgG-Antikörper von Patienten mit Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis (Patienten AK) keine guten Färbungen liefern, da die Konzentration von NR1-Autoantikörpern innerhalb des Gesamt-IgG-Pools womöglich nicht ausreichend war, um NR1 anzufärben. Außerdem könnten weitere, sich im Plasmapheresematerial befindende IgG-Antikörper zu unspezifischen Bindungen führen. Zukünftig könnten Optimierungsversuche unternommen werden, bei denen weitere Titrations durchgeföhrt werden, um ggf. eine bessere Antikörperkonzentration für die NR1-Färbungen herauszufinden. Außerdem könnte eine Lebendfärbung ausprobiert werden, indem vor dem Fixieren der Neuronen gefärbt wird. Das Fixieren einer Probe induziert Quervernetzungen zwischen den einzelnen Proteinen. Es ist bekannt, dass diverse Fixative eine Artefaktentstehung induzieren können (Whelan und Bell 2015) und somit ggf. auch Antikörperbindestellen blockieren könnten. Möglicherweise ist dies ein weiterer Grund für die ineffiziente NR1-Färbung mit kommerziellen Antikörpern. Dagegen erwiesen sich rekombinante monoklonale NR1-Patientenantikörper (003 102 NR1 mAK und 007 168 NR1 mAK) als sehr spezifisch und konnten gute Färbungen besonders in den hochaufgelösten *d*STORM-Bildern liefern. Kreye et al. fanden heraus, dass die rekombinanten monoklonalen NR1-Patientenantikörper das Epitop N368/G369 erkennen und somit nur eine Aminosäure auf der NR1-Untereinheit binden (Kreye et al. 2016) (Abbildung 3.6). Im Folgenden wurden deshalb verschiedene rekombinante monoklonale NR1-Patientenantikörper in Gehirnschnitten getestet.

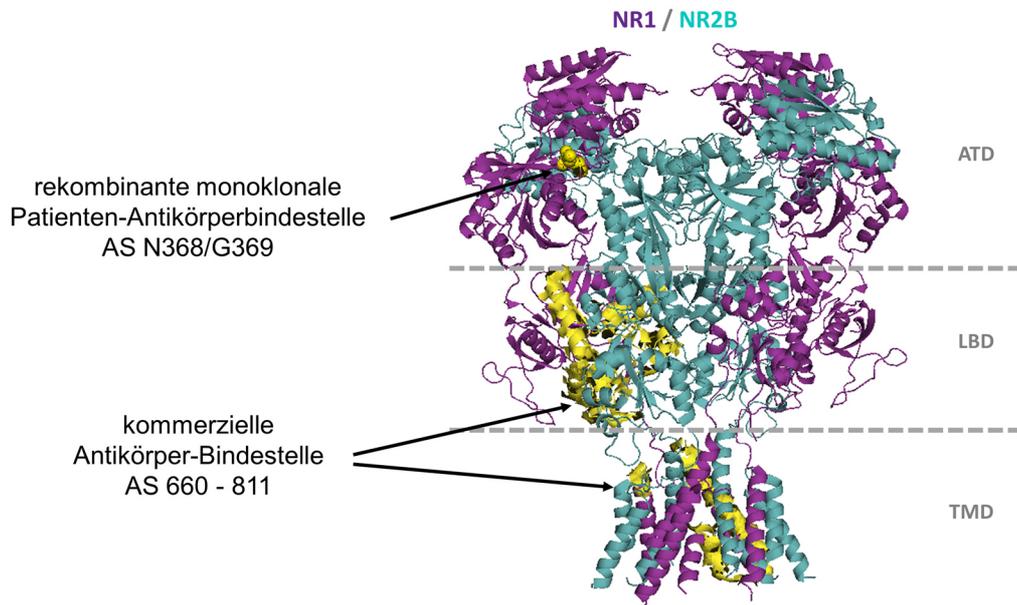


Abbildung 3.6: Bindestellen von kommerziellen bzw. rekombinanten monoklonalen Patientenantikörpern an die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors. Kommerzielle Antikörper gegen die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors (BD Bioscience und Merck Millipore) binden ein großes Epitop innerhalb der Ligand-Binde-Domäne (LBD) und der transmembranen Domäne (TMD) im Bereich der Aminosäuren 660 bis 811. Rekombinante monoklonale Antikörper von Patienten mit Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis binden hingegen das kleine extrazelluläre Epitop N368/G369 auf der aminoterminalen Domäne (ATD) von NR1. Dieses Epitop ist wahrscheinlich besser zugänglich und erzielt dadurch bessere Antikörperfärbungen. Beide Antikörperbindestellen wurden nur auf einer NR1-Untereinheit in der Kristallstruktur in gelb dargestellt (Protein-Datenbank PDB:4PE5).

3.1.3 NMDA-Rezeptor-Färbung in Gehirnschnitten

Kommerzielle Antikörper gegen die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors erwiesen sich in den vorherigen Experimenten als ineffizient und unspezifisch. Kreye et al. konnten verschiedene rekombinante monoklonale Antikörper von Patienten mit Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis herstellen (Kreye et al. 2016), die sich in unseren neuronalen Vorexperimenten als spezifische Antikörper gegen die NR1-Untereinheit herausstellten. Im Folgenden wurde die Affinität, Spezifität und Lokalisation diverser rekombinanter monoklonaler NR1-Patientenantikörper in murinen Gehirnschnitten mit hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie, sowohl mit SIM (Abbildung 3.7) als auch mit *d*STORM (Abbildung 3.8), analysiert.

3.1 Markierung des NMDA-Rezeptors durch Antikörperfärbung

Da NMDA-Rezeptoren besonders im Hippocampus des Gehirns exprimiert werden, wurden in den folgenden Versuchen die Cornu Ammonis (CA)-Regionen CA1- und CA3 sowie der Gyrus dentatus (DG) des Hippocampus betrachtet. Nach mehreren Versuchsreihen stellte sich heraus, dass sich unfixierte 10 μm dicke Mausgehirnschnitte besser für die Immunfärbungen eigneten als fixierte Gehirnschnitte. Möglicherweise bewirkte die Probenfixierung eine Maskierung der Epitope, die somit für Antikörper schlechter zugänglich wurden. Sowohl in SIM- als auch in *d*STORM-Messungen stellte sich heraus, dass der rekombinante monoklonale 007 168 NR1-Patientenantikörper die höchste Affinität zeigte, gefolgt von rekombinanten monoklonalen 003 102 NR1-Patientenantikörpern. Rekombinante monoklonale 003 109 NR1-Patientenantikörper zeigten dagegen kaum eine Färbung, ähnlich dem Kontroll mAK von einem gesunden Probanden (Abbildung 3.7 und 3.8). Der kommerzielle anti-NR1-Antikörper wurde nochmals mit SIM betrachtet, erwies sich jedoch erneut als ineffizient-bindender Antikörper und konnte deshalb für *d*STORM-Experimente nicht verwendet werden.

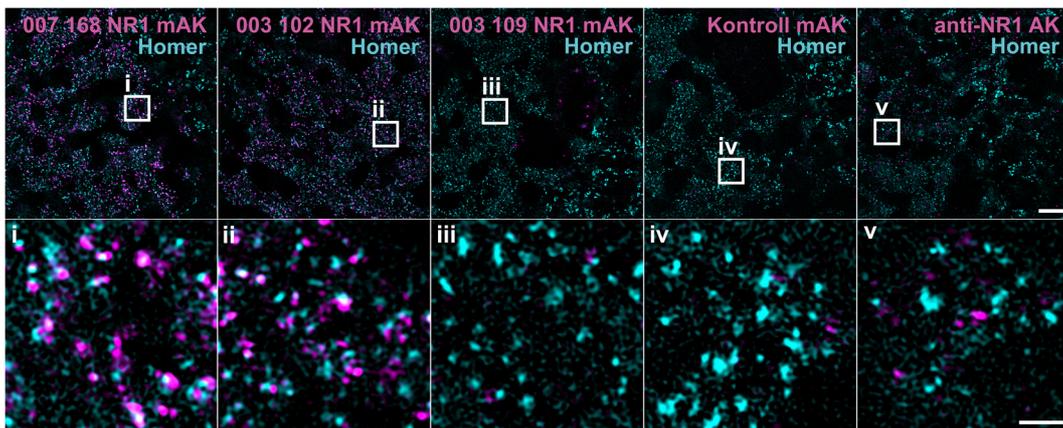


Abbildung 3.7: Zwei-Farben SIM von Homer und verschiedenen rekombinanten monoklonalen NR1-Patientenantikörpern in Gehirnschnitten. 10 μm unfixierte murine Gehirnschnitte wurden mit dem postsynaptischen Strukturprotein Homer (Sekundärantikörper gekoppelt an Alexa Fluor 532, cyan) und mit verschiedenen rekombinanten monoklonalen NR1-Patientenantikörpern angefärbt: 007 168 NR1 mAK, 003 102 NR1 mAK, 003 109 NR1 mAK, Kontroll mAK (jeweils Sekundärantikörper gekoppelt an Alexa Fluor 647, magenta) (von rechts nach links). Außerdem wurde mit dem kommerziellen anti-NR1-Antikörper (anti-NR1 AK; Sekundärantikörper gekoppelt an Alexa Fluor 647, magenta) gefärbt. SIM-Aufnahmen der CA3-Region des Hippocampus mit Maßstabsbalken 5 μm bzw. 1 μm in i-v.

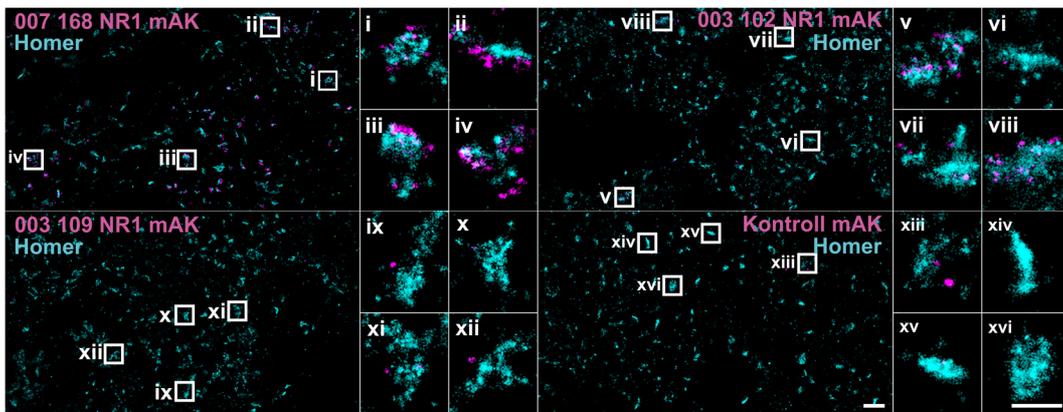


Abbildung 3.8: Zwei-Farben *d*STORM von Homer und verschiedenen rekombinanten monoklonalen NR1-Patientenantikörpern in Gehirnschnitten. 10 μm unfixierte murine Gehirnschnitte wurden mit dem postsynaptischen Strukturprotein Homer (Alexa Fluor 532 gekoppelter Sekundärantikörper, cyan) und mit verschiedenen monoklonalen rekombinanten NR1-Patientenantikörpern angefärbt: 007 168 NR1 mAK, 003 102 NR1 mAK, 003 109 NR1 mAK, Kontroll mAK (jeweils Alexa Fluor 647 gekoppelter Sekundärantikörper, magenta). *d*STORM-Aufnahmen der CA3-Region des Hippocampus mit Maßstab Balken 1 μm bzw. 0,5 μm in i-xvi.

Quantifizierende Analysen der Zwei-Farben *d*STORM-Daten von Homer und NR1 in Gehirnschnitten wurden mit Hilfe einer Python-Bibliothek, geschrieben von PD Dr. Sören Doose vom Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik der Universität Würzburg, durchgeführt. Dabei wurden die Lokalisationen der vier verschiedenen monoklonalen rekombinanten NR1-Patientenantikörper: 003 102 NR1 mAK, 003 109 mAK, 007 168 NR1 mAK und Kontroll mAK innerhalb der Homer-Cluster in den hippocampalen Regionen CA1, CA3 und DG miteinander verglichen. Zunächst wurde die Lokalisationspräzision aller Daten ermittelt. Diese ist laut Theorie indirekt proportional zur Quadratwurzel der Anzahl der detektierten Photonen im AN-Zustand der Fluorophore. Sowohl für Homer (Sekundärantikörper gekoppelt an Alexa Fluor 532) als auch für NR1 (Sekundärantikörper gekoppelt an Alexa Fluor 647) konnte eine Lokalisationsgenauigkeit von ~ 13 nm bestimmt werden. Mit Hilfe des Cluster-Algorithmus DBSCAN (engl. *density-based spatial clustering of applications with noise*) (Sander et al. 1998) wurden zunächst alle Homer-Cluster bestimmt. Hierbei ist es erforderlich den Abstand r zwischen zwei Nachbarn, ebenso wie die Mindestanzahl minPts an Nachbarn festzusetzen. Somit wurden für alle nachfolgenden Analysen nur diejenigen Homer-Cluster berücksichtigt, die mit den Parametern $r = 40$ nm und $\text{minPts} = 20$ gefunden wurden. Außerdem wurden nur Homer-Cluster mit einer Größe ab $50\,000$ nm² in die Analyse einbezogen. In Haselmann et al. 2018 wurden

AMPA-Rezeptor-Lokalisationen innerhalb von Homer-Cluster in primären hippocampalen Neuronen bestimmt. Dabei wurden nur diejenigen Homer-Cluster für Clusteranalysen verwendet, die eine Größe von 20 000 – 300 000 nm² aufwiesen. Möglicherweise bestehen leichte Unterschiede zwischen den Homer-Größen in primären Neuronen und Gehirnschnitten. Bei der Bestimmung der Größe der Homer-Fläche, zeigten Homer-Cluster in den Kontroll mAK-Färbungen im Mittel geringfügig kleinere Flächen, als diejenigen in allen anderen Experimenten (Abbildung 3.9 D). Die Größenverteilung im unteren Flächenbereich ist allerdings für alle Proben ähnlich. Normalerweise sollten Homer-Cluster in allen Färbungen dieselbe Größe aufweisen, da alle mit den gleichen Antikörpern unter gleichen Bedingungen gefärbt wurden. Möglicherweise war der Grund für die geringfügig kleinere Größe der Homer-Cluster in Kontroll mAK-Färbungen die geringere Anzahl an Kontroll-Daten von $n = 3$ gegenüber allen anderen Färbungen, bei denen zufällig kleinere Synapsen dominierten. Anschließend wurde für NR1 eine DBSCAN-Clusteranalyse mit den Parametern $r = 16$ nm und $\text{minPts} = 4$ durchgeführt, sodass NR1-Cluster und NR1-Lokalisationen sowohl innerhalb als auch außerhalb der definierten Homer-Cluster identifiziert werden konnten. Dabei wurden alle NR1-Lokalisationen innerhalb der Homer-Cluster als synaptische Rezeptoren und alle NR1-Lokalisationen in einem Abstand von bis zu 1000 nm als extrasynaptisch definiert. NR1-Färbungen mit dem monoklonalen rekombinanten NR1-Patientenantikörper 007 168 zeigten eine deutlich höhere NR1-Lokalisationsdichte sowohl innerhalb als auch außerhalb der Homer-Cluster als alle anderen Antikörperfärbungen (Abbildung 3.9 B und C). Dies deutet auf eine höhere Spezifität und Affinität des 007 168 NR1 mAK hin. Somit bestätigte dieses Ergebnis die vorherigen LSM-, SIM- und dSTORM-Aufnahmen, bei denen der 007 168 NR1 mAK eine bessere Spezifität zeigte als alle anderen NR1-Antikörper. In der histogrammierten Darstellung wies der 007 168 NR1 mAK eine exponentielle Verteilung der NR1-Lokalisationsdichte innerhalb der Synapse auf. Somit gab es sowohl viele Synapsen, die keine oder eine sehr geringe Anzahl an NR1-Lokalisationen aufwiesen, ebenso wie Synapsen, die sehr hohe NR1-Lokalisationsdichten besaßen. Der monoklonale rekombinante NR1-Patientenantikörper 003 102 zeigte die zweit-höchste NR1-Dichte inner- und außerhalb der Synapsen. Im Histogramm wies er ähnliche Verteilungen auf wie der 007 168 NR1 mAK, wobei die NR1-Lokalisationsdichte geringer war (Abbildung 3.9 B). Die geringe Spezifität des 003 109 NR1 mAK und des Kontroll mAK äußerte sich dagegen in der geringen NR1-Lokalisationsdichte, sowohl innerhalb als auch außerhalb der Homer-Cluster. In deren Verteilung waren überwiegend Synapsen mit geringen NR1-Lokalisationen erkennbar.

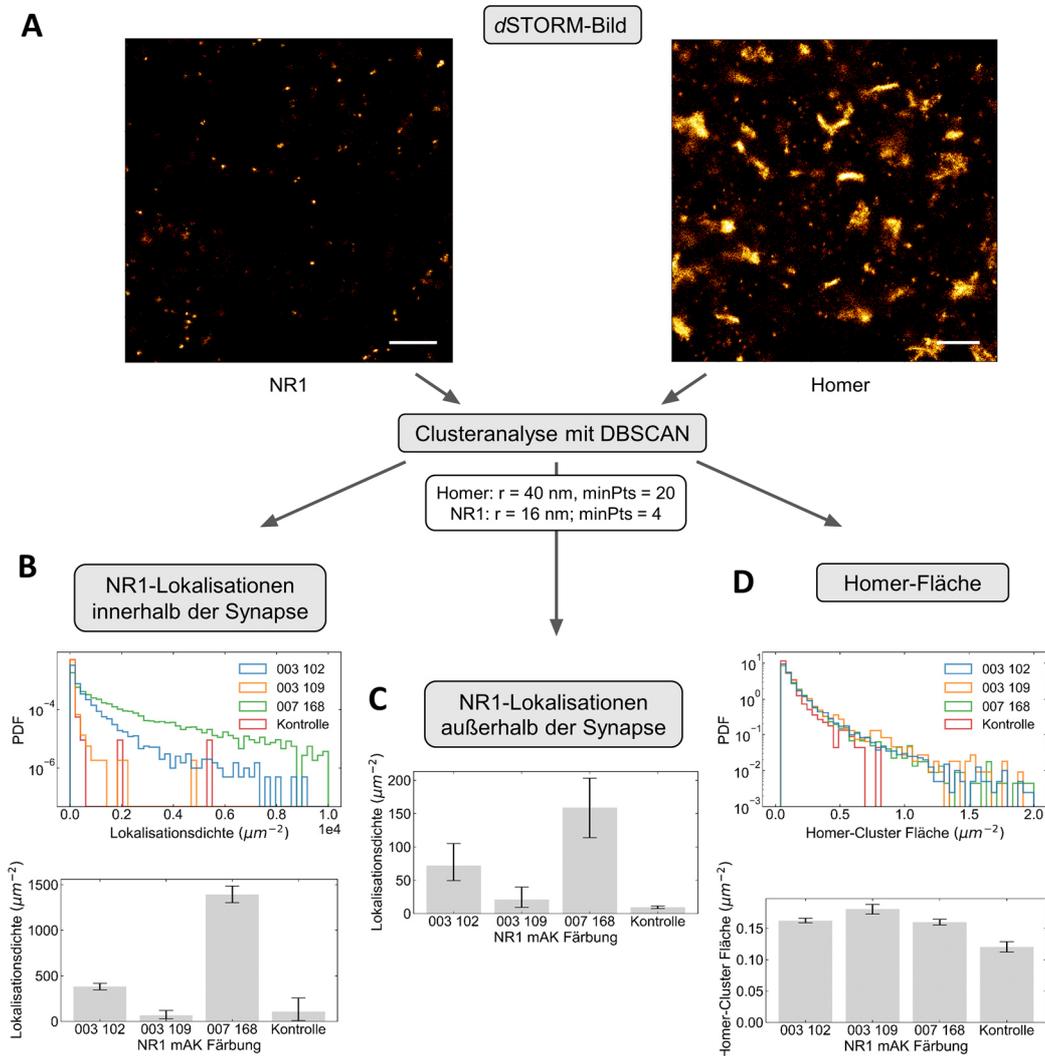


Abbildung 3.9: Homer- und NR1-Clusteranalysen von Gehirnschnittfärbungen mit verschiedenen rekombinanten monoklonalen NR1-Patientenantikörpern. (A) dSTORM-Aufnahmen von NR1 (exemplarisch dargestellt für die 007 168 NR1 mAK-Färbung) und Homer in hippocampalen Gehirnschnitten. Die Maßstabsbalken entsprechen $1 \mu\text{m}$. (B) Mit Hilfe von DBSCAN wurden alle NR1- und Homer-Cluster mit den dargestellten Parametern r und minPts bestimmt. NR1-Lokalisierungen innerhalb der Homer-Cluster wurden als synaptisch definiert und für die verschiedenen NR1-Färbungen mit 007 168 NR1 mAK, 003 102 NR1 mAK, 003 109 NR1 mAK und Kontroll mAK im Histogramm (oben) und Balkendiagramm (unten) dargestellt. (C) NR1-Lokalisierungen außerhalb der Homer-Cluster in einem Abstand von bis zu 1000 nm wurden als extrasynaptisch definiert und für die verschiedenen NR1-Färbungen als Balkendiagramm abgebildet. (D) Sowohl im Histogramm (oben) als auch im Balkendiagramm (unten) zeigten Homer-Cluster für die verschiedenen NR1-Färbungen ähnliche Größen. Fehlerbalken repräsentieren das 95 %-Konfidenzintervall für den Mittelwert, das durch ein Bootstrapping-Verfahren berechnet wurde.

Zusätzlich wurden sowohl die Fläche als auch die Lokalisationsdichte innerhalb der definierten NR1-Cluster für die verschiedenen rekombinanten monoklonalen NR1-Patientenantikörpern bestimmt. Dabei konnte der 007 168 NR1 mAK, gefolgt vom 003 102 NR1 mAK, die größte NR1-Fläche (Abbildung 3.10 C) und höchste Dichte an Lokalisationen innerhalb der Cluster (Abbildung 3.10 D) erzielen. Erstaunlicherweise zeigte der 007 168 NR1 mAK eine fast doppelt so große NR1-Fläche und Lokalisationsdichte als der 003 102 NR1 mAK. Aufgrund seiner höheren Affinität und Spezifität bindet der 007 168 NR1 mAK womöglich beide NR1-Untereinheiten des NMDA-Rezeptors, was die doppelte Lokalisationsdichte erklären könnte. Dagegen zeigten 003 109 NR1 mAK und Kontroll mAK eine deutlich geringere Clustergröße und Lokalisationsdichte. Deren große Fehlerbalken im Balkendiagramm der Lokalisationsdichten sind im Histogramm als Ausreißer zu erkennen, bei denen vereinzelt, im Vergleich zum geringen Mittelwert, eine hohe Lokalisationsanzahl auftrat.

Die Ergebnisse zeigten, dass der rekombinante monoklonale 007 168 Patientenantikörper eine deutlich bessere NR1-Färbung erzielte als kommerziell erhältliche NR1-Antikörper, da diese meist einen großen Epitopbereich innerhalb der Ligand-Binde-Domäne (LBD) und der transmembranen Domäne (TMD) der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors binden. Der rekombinante monoklonale NR1-Patientenantikörper bindet hingegen den kleinen Bereich N368/G369 im extrazellulären Loop der NR1-Untereinheit. Durch dessen bessere Epitop-Zugänglichkeit ist dieser am besten geeignet für eine NR1-Immunfluoreszenzfärbung. Clusteranalysen zeigten, dass der 007 168 NR1 mAK, im Gegensatz zu allen anderen rekombinanten monoklonalen NR1-Patientenantikörpern, eine höhere Lokalisationsdichte sowohl innerhalb als auch außerhalb der Synapse aufwies. Somit konnte gezeigt werden, dass sich synaptische ebenso wie extrasynaptische NMDA-Rezeptoren mit Hilfe des 007 168 NR1 mAK am besten anfärben ließen. Als synaptisch wurden alle diejenigen NR1-Lokalisationen bezeichnet, die sich innerhalb der Homer-Cluster befinden. Da eine Synapse jedoch größer als die Homer-Fläche ist, könnten in unseren Ergebnissen ebenso einige NR1-Lokalisationen enthalten sein, die wir als außerhalb definiert haben, sich in Wahrheit aber innerhalb der Synapse befinden. In Ladépêche et al. wurden NMDA-Rezeptoren zusammen mit PSD-95 nach einer Inkubation mit Liquor von Patienten mit Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis mit Hilfe von STORM betrachtet. Hier wurden alle diejenigen NR1-Lokalisationen, die sich innerhalb von 200 nm um das Zentrum der PSD-95-Cluster befinden, als synaptisch bestimmt (Ladépêche et al. 2018).

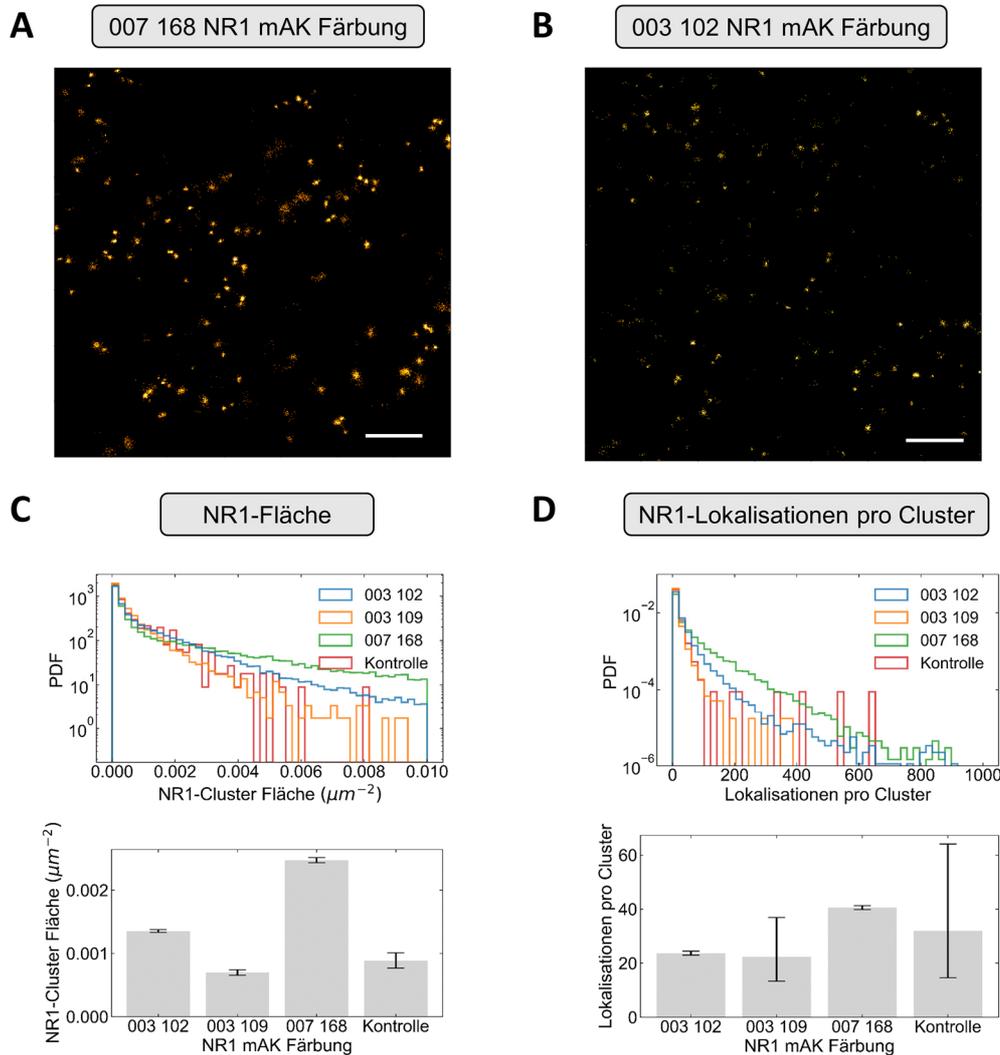


Abbildung 3.10: Flächengröße und Lokalisationsdichte der NR1-Cluster von Gehirnschnittfärbungen mit den verschiedenen rekombinanten monoklonalen NR1-Patientenantikörpern. dSTORM-Aufnahmen von Homer und NR1 exemplarisch dargestellt für die (A) 007 168 NR1 mAK-Färbung und (B) 003 102 NR1 mAK-Färbung in hippocampalen Gehirnschnitten. In der 007 168 NR1 mAK-Färbung sind die größeren NR1-Cluster bereits erkennbar. Die Maßstabsbalken entsprechen $1 \mu\text{m}$. (C) NR1-Cluster wurden mit DBSCAN bestimmt und deren Flächengröße als Histogramm (oben) und Balkendiagramm (unten) dargestellt. (D) Zusätzlich wurden NR1-Lokalisationsdichten innerhalb der Cluster für die jeweiligen rekombinanten monoklonalen NR1-Patientenantikörper im Histogramm (oben) und Balkendiagramm (unten) gezeigt. 007 168 NR1 mAK wies sowohl größere NR1-Flächen als auch höhere NR1-Lokalisationsdichten auf, im Gegensatz zu allen anderen Antikörpern. Fehlerbalken repräsentieren das 95 %-Konfidenzintervall für den Mittelwert, das durch ein Bootstrapping-Verfahren berechnet wurde.

Bei dieser Definition können ebenfalls Fehler entstehen, indem viele extrasynaptische NR1-Lokalisationen versehentlich als synaptisch eingestuft wurden. Allerdings muss an dieser Stelle beachtet werden, dass für deren Experimente primäre Neuronen verwendet wurden, bei denen die Synapsengröße von der Dauer der Neuronenkultur abhängt. Gehirnschnitte einer adulten Maus sollten dagegen ausgereifte Synapsen aufweisen. Ladépêche et al. stellten außerdem dar, dass NMDA-Rezeptoren in einzelnen Nanoclustern organisiert sind. Unsere Ergebnisse zeigten, dass Färbungen mit dem 007 168 NR1 mAK sehr hohe NR1-Lokalisationsdichten in vielen Homer-Clustern verursachten. Möglicherweise waren auch hier mehrere NMDA-Rezeptor-Nanocluster innerhalb der Synapse vorhanden. Dies deutet auf eine sehr hohe Spezifität und Affinität des 007 168 NR1 mAK hin, was die vorherigen Ergebnisse der LSM-, SIM- und *d*STORM-Aufnahmen bestätigt. Außerdem wies dieser ungefähr doppelt so viele Lokalisationen innerhalb der NR1-Cluster auf als der 003 102 NR1 mAK. Womöglich konnte der 007 168 NR1 mAK beide NR1-Untereinheiten des NMDA-Rezeptors binden, was dem 003 102 NR1 mAK aufgrund seiner geringeren Affinität nicht möglich war. Ein weiterer Grund für die erhöhte Lokalisationsdichte könnte eine 007 168 NR1 mAK-induzierte Clusterbildung sein. Eventuell verursacht dieser Antikörper ein artifizielles Clustern der NMDA-Rezeptoren, was ebenso die erhöhte NR1-Clustergröße erklären könnte. In zukünftigen Experimenten sollten die rekombinanten monoklonalen NR1-Patientenantikörper direkt an einen Farbstoff markiert werden, sodass auf den Sekundärantikörper verzichtet werden kann. Unter Umständen kann dadurch ein Clustern des Rezeptors verhindert werden.

Antikörper haben den großen Vorteil, dass sie an alle möglichen Fluorophore gekoppelt werden können und somit ein großes Spektrum aufweisen. Allerdings sind sie für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie eher von Nachteil, da sie mit einer Größe von 10 – 15 nm sehr groß sind. Bei einer indirekten Immunmarkierung mit primären und sekundären Antikörpern kann der Abstand von Zielstruktur und Fluorophor bis zu 30 nm betragen. Dies bedeutet eine Auflösungsverminderung, insbesondere für *d*STORM-Messungen, bei denen eine maximale Auflösung von bis zu 20 nm erreicht werden kann. Außerdem könnte ein großer Antikörper gebunden am Zielprotein die natürlichen Eigenschaften und Funktionen des Proteins innerhalb der Zelle beeinflussen. Deshalb werden in den folgenden Kapiteln dieser Arbeit alternative Färbemöglichkeiten mit deutlich kleineren Markierungen dargestellt.

3.2 Gephyrin-Färbung durch Super-Binde-Peptide

Da die Fähigkeit biologische Strukturen aufzulösen, nicht nur von der optischen Auflösung abhängt sondern ebenso von der Markierungsgröße und -dichte, wurden Peptide mit einer Größe von $\sim 2,5$ nm und damit wesentlich kleiner als Antikörper als weitere Markierungsmöglichkeit für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie in dieser Arbeit verwendet. Dr. Hans M. Maric et al. haben ein Verfahren entwickelt, um kompakte hochaffin bindende Peptide, sog. „Super-Binde-Peptide“ (SBPs), herzustellen, um diese mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie zu nutzen (Maric et al. 2017). Mit Hilfe einer Mikrochip-Technologie konnte ein kleines, hochspezifisches und effektiv bindendes Peptid für das Synapsen-Ankerprotein Gephyrin entwickelt werden. Dazu wurde zunächst die Konsensussequenz für die Gephyrin-Bindung mit Hilfe der Mikrochip-Technologie bestimmt. Anschließend konnte das Peptid mit zusätzlichen Eigenschaften versehen werden, wie erhöhter Bindeaffinität, Membranpermeabilität und Fluoreszenzkopplung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodamin (TMR) an den Aminoterminus des Peptids. Gephyrin selbst ist ein Ankerprotein, das die beiden inhibitorischen GABA_A- und Glycin-Rezeptoren auf der postsynaptischen Membran mit dem Cytoskelett der Zelle verbindet und clustert. Es ist damit für die Organisation, Struktur, Funktion und Plastizität der Synapse zuständig, was bei einer Dysfunktion zu diversen neurologischen Erkrankungen führen kann (Fang et al. 2011; Rees et al. 2003; Lionel et al. 2013; Butler et al. 2000). In dieser Arbeit wurde die Spezifität verschiedener Gephyrin-SBPs in primären Mausneuronen mit Hilfe von SIM getestet und mit kommerziellen Gephyrin-Antikörpern verglichen. Zusätzlich wurden die inhibitorischen präsynaptischen vesikulären GABA-Transporter (VGAT) bzw. die excitatorischen präsynaptischen vesikulären Glutamattransporter (VGLUT1) angefärbt. VGAT ist für die Aufnahme und Lagerung von GABA und Glycin in den inhibitorischen präsynaptischen Vesikeln verantwortlich und damit ein guter Marker für hemmende Synapsen. VGLUT1 ist dagegen für die Glutamataufnahme in excitatorischen präsynaptischen Vesikeln zuständig und somit ein guter Marker für erregende Synapsen. In unseren Experimenten wurden sowohl DIV21 (Abbildung 3.11) als auch DIV14 (Abbildung 3.12) fixierte primäre Neuronen zunächst mit VGAT bzw. VGLUT1 durch indirekte Immunfärbung mit kommerziell erhältlichen Antikörpern angefärbt. Anschließend wurde Gephyrin mit den SBPs TMR-2i bzw. TMR-2j für 13 Minuten gefärbt. Es stellte sich heraus, dass das Hinzufügen des ungelabelten Kontrollpeptids 2j sowohl in die Block- als auch in die Antikörperlösungen zu spezifischeren Färbungen führte. Pixelbasierte Kollisionsanalysen, bei denen 10 neuronale Regionen innerhalb der

SIM-Aufnahmen ausgewählt wurden, zeigten, dass das TMR-2i Peptid mit VGAT zu 48,3 % in DIV21 Neuronen und zu 19,3 % in DIV14 Neuronen kolokalisierte, jedoch nicht mit dem Kontrollpeptid TMR-2j (0,2 % in DIV21 Neuronen und 0,4 % in DIV14 Neuronen) (Abbildung 3.11 und 3.12). Sowohl das präsynaptische VGAT als auch das postsynaptische Gephyrin befinden sich in inhibitorischen Synapsen, was eine Kolokalisation beider Proteine erklärt. VGLUT1 ist im Gegensatz zu Gephyrin auf excitatorischen Synapsen lokalisiert, sodass keine Kolokalisation von TMR-2i mit VGLUT1 festgestellt werden konnte. TMR-2i kolokalisierte deshalb nur zu 3,3 % mit VGLUT1 in DIV21 Neuronen und zu 0,7 % in DIV14 Neuronen (Abbildung 3.11 und 3.12). Die Kolokalisationsanalysen zeigten einen signifikanten Unterschied ($P < 0,05$) zwischen TMR-2i mit VGAT zu allen anderen Experimenten, einschließlich denen mit VGLUT1 oder dem Kontrollpeptid TMR-2j. Demnach konnte eine klar definierte Gephyrin-Färbung mit SBPs in inhibitorischen Synapsen erreicht werden. Da SIM eine laterale Auflösung jenseits der Größe einer typischen Synapse aufweist, konnte zwischen prä- und postsynaptischer Lokalisation von VGAT und Gephyrin-SBP TMR-2i in allen SIM-Bildern unterschieden werden. Somit kam es nur zu einer geringfügigen Überlappung zwischen prä- und postsynaptischen Markern, sodass die ausgewerteten Pixel-basierten numerischen Werte für die Kolokalisation von Gephyrin mit VGAT keine quantitativen Zahlen lieferten. Im Gegensatz zur kommerziellen Gephyrin-Antikörperfärbung (mab7a) zeigten die SBPs eine dichtere Gephyrin-Färbung und eine bessere Clusterrepräsentation, deren Größe unterhalb der SIM-Auflösung ist (Abbildung 3.11 A). Gephyrin-Antikörper wiesen dagegen größere Cluster auf, die dadurch mehr mit der Präsynapse, also mit VGAT, überlagerten (Abbildung 3.11 B). Dies könnte eine höhere Kolokalisationsrate von Gephyrin-Antikörpern mit VGAT in DIV14 Neuronen (29,7 %) als die von TMR-2i Peptiden (19,3 %) erklären. Bei einer indirekten Gephyrin-Antikörperfärbung kann das Fluorophor mit einem Abstand von bis zu 30 nm vom Antigen entfernt sein, was eine Auflösungsverminderung, besonders für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie, bedeutet. Außerdem können mehr als nur ein einziger Sekundärantikörper an einen Primärantikörper binden, was zu einer Signalverstärkung und weiteren Vergrößerung des Antikörperkomplexes von bis zu 50 nm führen kann. Somit waren Antikörper-gefärbte Gephyrin-Cluster größer als SBP-gefärbte Gephyrin-Cluster und konnten mehr mit dem präsynaptischen VGAT kolokalisieren.

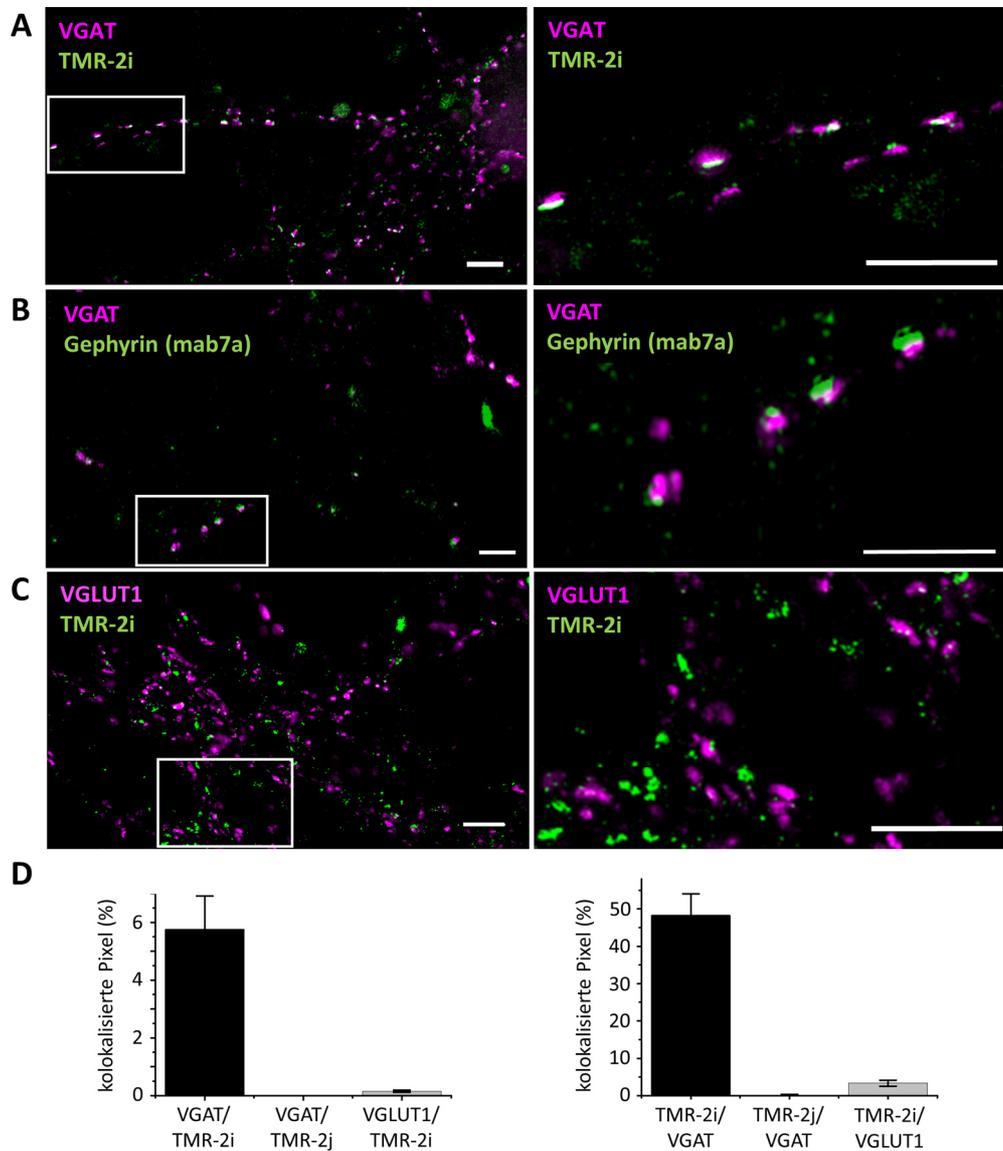


Abbildung 3.11: Kolokalisation von Gephyrin-SBPs mit VGAT bzw. VGLUT1 in DIV21 Neuronen. Fixierte primäre hippocampale Neuronen (DIV21 bzw. DIV14 in B) wurden mit Antikörpern gegen inhibitorisches präsynaptisches VGAT (Alexa Fluor 647 gekoppelter Sekundärantikörper, magenta) (A und B), excitatorisches präsynaptisches VGLUT1 (Alexa Fluor 647 gekoppelter Sekundärantikörper, magenta) (C) und mit 2 nM des Gephyrin-SBPs TMR-2i (grün) (A und C) gefärbt. Außerdem wurde VGAT zusammen mit dem kommerziellen anti-Gephyrin (mab7a) Antikörper (grün) angefärbt (B). SIM-Aufnahmen mit Maßstabsbalken 5 μm in A-C. (D) Der prozentuale Anteil kolokalisierter Pixel des SBPs TMR-2i mit VGAT zeigte einen signifikanten Unterschied ($P < 0,05$) zu allen anderen Experimenten in DIV21 Neuronen. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von 10 neuronalen Regionen. Mit Erlaubnis bearbeitet nach Maric et al. 2017.

In DIV21 Neuronen konnte eine deutlich höhere Kollokalisationsrate festgestellt werden als in DIV14 Neuronen. So kollokalisieren 19,3 % des Gephyrin-SBPs TMR-2i mit VGAT in DIV14 Neuronen, in DIV21 Neuronen waren es dagegen 48,3 %. Danglot et al. stellten ebenso fest, dass Gephyrin im Laufe der neuronalen Entwicklung vermehrt mit VGAT kollokalisiert (Danglot et al. 2003). Gephyrin befand sich am Anfang der Entwicklung noch weitestgehend im extrasynaptischen Bereich, während es im Laufe der Entwicklung zunehmend im synaptischen Bereich lokalisiert war. Außerdem beobachteten Danglot et al., dass Gephyrin am Beginn der neuronalen hippocampalen Entwicklung (DIV3) nur sehr wenige kleine Cluster aufwies. In DIV10 Neuronen konnten wenige aber deutlich hellere und größere Cluster beobachtet werden. Im Laufe der weiteren neuronalen Entwicklung (DIV17 und DIV21) bildete Gephyrin immer größere Cluster aus (Craig et al. 1996; Danglot et al. 2003), was die erhöhte Kollokalisierung mit VGAT in DIV21 Neuronen in unseren Experimenten erklären könnte.

Die Ergebnisse zeigten, dass sich das hochaffine Farbstoff-gekoppelte Super-Binde-Peptid TMR-2i als neuer, effektiver, direkter Marker für das Ankerprotein Gephyrin erwies. Mit dieser Methode kann auf komplexe indirekte Immunfärbungen verzichtet werden und stattdessen direkt mit dem SBP innerhalb kürzester Inkubationszeiten von lediglich 13 Minuten gefärbt werden. Darüber hinaus reichen sehr geringe Konzentrationen von nur 2 nM der SBPs aus, um eine deutliche Färbung zu erzielen. SBPs haben zahlreiche weitere Vorteile, wie chemische Stabilität und Resistenz, geringe Kosten und verbesserte Affinität. Mit einer Größe von $\sim 2,5$ nm sind SBPs relativ klein und damit wesentlich besser für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie geeignet als konventionelle Antikörperfärbungen. Jedoch brachten auch sie anfangs Schwierigkeiten wegen unspezifischer Bindungen mit sich, die erst durch ein zusätzliches Abblocken von BSA und dem 2j-Kontrollpeptid unterbunden werden konnten. Demnach müssen bei SBP-Färbungen ebenso zunächst die perfekten Färbbedingungen ausgetestet werden, um bestmögliche Ergebnisse zu erzielen. Ein weiterer Nachteil ist die aufwendige Herstellung der SBPs, die nicht jedes Labor eigenständig realisieren kann. Zur Ermittlung der Konsensussequenz müssen zunächst diverse thermodynamische und strukturelle Analysen durchgeführt werden. Darauf aufbauend werden viele modifizierte Peptide hergestellt, die möglichst gleichzeitig mit modernen Mikrochip-Technologien analysiert werden, um letztendlich das Peptid mit der höchsten Spezifität herauszufinden. Diese Analysen nehmen sehr viel Zeit in Anspruch. Im Folgenden wird eine weitere Färbemethode mit sogar noch kleineren Markierungen dargestellt.

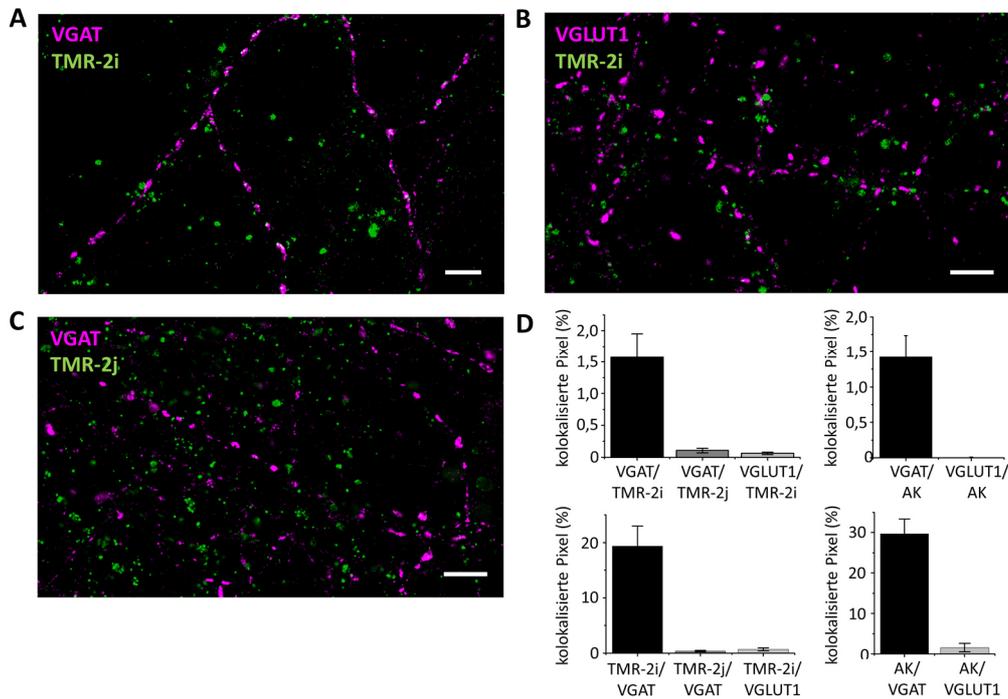


Abbildung 3.12: Kolokalisation von Gephyrin-SBPs mit VGAT bzw. VGLUT1 in DIV14 Neuronen. Fixierte primäre hippocampale Neuronen (DIV14) wurden mit Antikörpern gegen inhibitorisches präsynaptisches VGAT (Alexa Fluor 647 gekoppelter Sekundärantikörper, magenta) (A und C) oder excitatorisches präsynaptisches VGLUT1 (Alexa Fluor 647 gekoppelter Sekundärantikörper, magenta) (B) gefärbt. Zusätzlich wurde mit 2 nM der Gephyrin-SBPs TMR-2i (A und B) bzw. der Negativkontrolle TMR-2j (C) (grün) gefärbt. SIM-Aufnahmen mit Maßstabsbalken 5 μ m in A-C. (D) Pixel-basierte Kolokalisationsanalysen der SBPs TMR-2i bzw. TMR-2j mit der Immunfärbung von VGAT bzw. VGLUT1 und der konventionellen indirekten Gephyrin-Immunfärbung in DIV14 Neuronen. In allen vier Graphen gab es signifikante Unterschiede zwischen dem ersten Mittelwert und allen anderen Mittelwerten ($P < 0,05$), was eine klar definierte Gephyrin-Färbung in inhibitorischen Synapsen zeigte. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von 10 neuronalen Regionen. Mit Erlaubnis bearbeitet nach Maric et al. 2017.

3.3 Bioorthogonale Click-Färbung des NMDA-Rezeptors durch GCE

Die bioorthogonale Click-Färbung durch die Erweiterung des genetischen Codes (engl. *genetic code expansion*, GCE) ist eine äußerst spezifische Methode, um Proteine mit diversen Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren. Hierfür wird eine unnatürliche, nicht-kanonische Aminosäure (engl. *non-canonical amino acid*, ncAA) ins Zielprotein eingebaut und anschließend mit Hilfe der Click-Chemie ortsspezifisch mit organischen Fluorophoren angefärbt. Diese Methode eignet sich besonders für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie, da organische Fluorophore mit einer Größe von nur 0,5 – 3 nm noch kleiner sind als die vorherigen Markierungsmethoden dieser Arbeit und damit sowohl die Auflösung als auch die natürlichen Prozesse in der Zelle kaum beeinflussen. Außerdem wird durch die Click-Färbung eine kovalente Bindung zwischen Zielprotein und organischem Fluorophor erzeugt, was eine hohe Färbefizienz und Spezifität garantiert. Zusätzlich erlaubt die Ortsspezifität und Stöchiometrie eine quantitative Auswertung, da eine einzige Aminosäure mit nur einem Fluorophor kovalent markiert ist. In dieser Arbeit wurde der NMDA-Rezeptor mit Hilfe bioorthogonaler Click-Färbung durch GCE markiert und mit Antikörperfärbung auf Konfokalmikroskopie- und dSTORM-Ebene verglichen.

3.3.1 Spezifität der bioorthogonalen Click-Markierung

Für die Erweiterung des eukaryotischen genetischen Codes wurde in dieser Arbeit die *Amber*-Suppressionsmethode verwendet, bei der das *Amber*-Stopcodon (UAG) genutzt wird, um eine zusätzliche unnatürliche Aminosäure ins Genom einzubauen und anschließend spezifisch anzufärben. Diese Methode wurde von Gerti Beliu in die Arbeitsgruppe vom Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik der Universität Würzburg eingeführt und vorangebracht. Es wurden zunächst verschiedene *Amber*-Mutanten der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors mit Hilfe ortsspezifischer Mutagenese hergestellt und auf ihre Expression und Spezifität getestet. Mit Hilfe der bereits bekannten Kristallstruktur des NMDA-Rezeptors (Karakas und Furukawa 2014; Lee et al. 2014; Rau et al. 2014) wurden vielversprechende Positionen in der extrazellulären aminoterminalen Domäne (ATD) der NR1-Untereinheit ausgewählt, um ncAAs zu integrieren. Letztendlich wurden sieben verschiedene Click-Positionen (K275TAG, K298TAG, K378TAG, K388TAG, Y392TAG, S395TAG, K421TAG) auf ihre Expression und Spezifität in HEK293T-Zellen getestet (Abbildung 3.13). Hierfür wurden

HEK293T-Zellen mit der NR1-*Amber*-Mutante, NR2B und dem tRNA/RS-Plasmid (tRNA^{Pyl}/NESPyIRS^{AF}) in Anwesenheit der unnatürlichen Aminosäure *trans*-Cyclooct-2-en-L-Lysin (TCO*A) für 4 – 8 Stunden transfiziert. Zusätzlich wurde Ketamin als Kanalblocker ins Zellmedium gegeben, um Kalziumeinströmungen in die Zelle zu verhindern (Emnett et al. 2013; Guo et al. 2017). Die Koexpression mit NR2B ist notwendig, um einen funktionalen NMDA-Rezeptor in der Zellmembran zu exprimieren (Akashi et al. 2009; Kumar 2015). Durch die Transfektion des tRNA^{Pyl}/NESPyIRS^{AF}-Plasmids kann die Zelle neben kanonischen auch orthogonale tRNAs produzieren, die durch die zugehörigen orthogonalen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (RS) mit den ncAAs beladen werden. Sobald nun das *Amber*-Codon auf der abgelesenen mRNA während der Translation im Ribosom erscheint, bindet die beladene orthogonale tRNA und die unnatürliche Aminosäure TCO*A kann in die Polypeptidkette eingebaut werden. Somit erhielt man einen NMDA-Rezeptor, der in seiner NR1-Untereinheit eine ncAA trägt. Das NR1-*Amber*-Plasmid hatte nach der NR1-*Amber*-Sequenz (carboxyterminal) ein EGFP als Positivkontrolle fusioniert, das nur dann exprimiert wurde, wenn die *Amber*-Mutation durch den ncAA-Einbau unterdrückt wurde. Das eingebaute TCO*A wurde schließlich nach 12 – 36 Stunden Inkubationszeit mit Hilfe der bioorthogonalen Click-Reaktion SPIEDAC mit 1,5 μ M Cy5-Tetrazin (H-tet-Cy5) für 10 Minuten auf Eis angefärbt, fixiert und mit Hilfe der Konfokalmikroskopie analysiert. Alle sieben NR1-*Amber*-Mutanten zeigten gleiche EGFP-Expressionen, jedoch verschiedene H-tet-Cy5 Intensitäten (Abbildung 3.13). Die Mutante Y392TAG lieferte das hellste und effizienteste Click-Signal und wurde deshalb für alle folgenden Experimente verwendet. Dagegen zeigten die beiden Mutanten K378TAG und K421TAG kaum H-tet-Cy5 Signal. Möglicherweise waren beide Click-Positionen nur sehr schlecht zugänglich und wiesen aufgrund dessen sehr schwache Membranfärbungen auf.

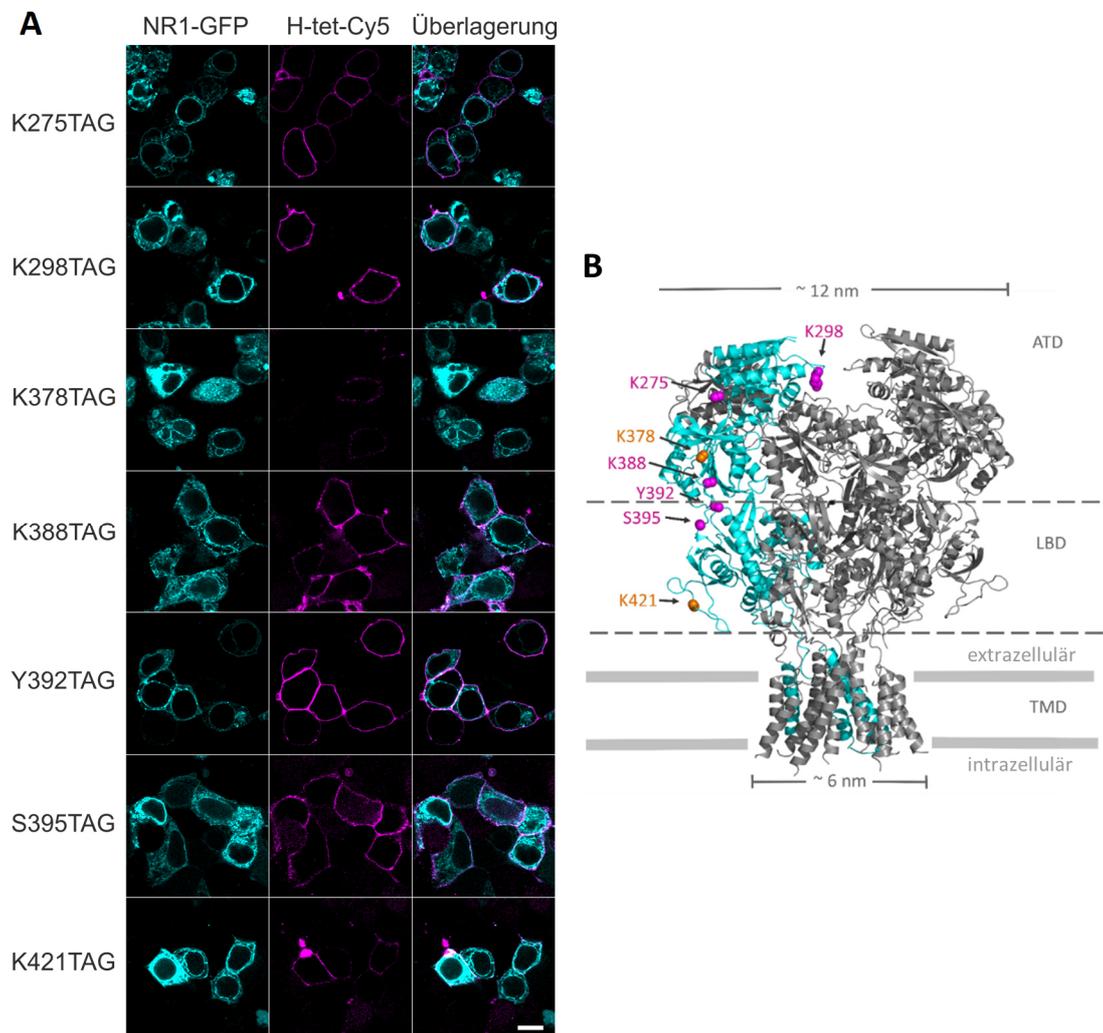


Abbildung 3.13: Expression und bioorthogonale Click-Färbung durch GCE verschiedener NR1-Amber-Mutanten. (A) Sieben verschiedene NR1-Amber-Mutanten (K275TAG, K298TAG, K378TAG, K388TAG, Y392TAG, S395TAG, K421TAG) wurden mit Hilfe ortsspezifischer Mutagenese hergestellt und auf ihre Expression und Spezifität getestet. Dazu wurden HEK293T-Zellen mit der jeweiligen NR1-Amber-Mutante, NR2B und tRNA^{Pyl}/NES^{Pyl}RS^{AF} in Anwesenheit der clickbaren unnatürlichen Aminosäure TCO*^A transfiziert und bioorthogonal mit H-tet-Cy5 für 10 Minuten auf Eis gefärbt. Konfokale Fluoreszenzaufnahmen zeigten die Färbefeffizienz der verschiedenen Mutanten (EGFP-Expression in cyan und H-tet-Cy5 Signal in magenta). Die Click-Mutante Y392TAG zeigte das hellste Signal und wurde für weitere Experimente verwendet. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm . (B) In der Kristallstruktur des NMDA-Rezeptors (PDB: 4PE5) wurden die verschiedenen Positionen der NR1-Amber-Mutanten auf der extrazellulären ATD bzw. LBD der NR1-Untereinheit eingezeichnet. Dabei kennzeichnen Click-Positionen in magenta bzw. orange gute bzw. schlechte Positionen. Mit Erlaubnis bearbeitet nach Neubert et al. 2018, © 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Um die Spezifität der bioorthogonalen Click-Färbung zu testen, wurden HEK293T-Zellen mit der Y392TAG-NR1, NR2B und tRNA^{Pyl}/NESPylRS^{AF} in Anwesenheit von TCO*A transfiziert und mit 1,5 μ M H-tet-Cy5 gefärbt. Dabei stellte sich heraus, dass die EGFP-Expression sowohl von der NR1-*Amber*-Mutante Y392TAG als auch vom NR1-Wildtyp (NR1-WT) in der Zellmembran und ebenso in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert war (Abbildung 3.14). Wahrscheinlich akkumulierte sehr viel überexprimiertes NR1 im endoplasmatischen Retikulum (Ramberger et al. 2015; McIlhinney et al. 1998). Dagegen war die bioorthogonale H-tet-Cy5 Click-Färbung nur in der Plasmamembran lokalisiert. Dies bestätigte, dass die Membran für den Tetrazin-Farbstoff H-tet-Cy5 nicht permeabel war und Internalisierungsprozesse das Membransignal in der Zeitperiode zwischen Färbung bis Fixierung nicht beeinflussten. Es wurden drei verschiedene Kontrollexperimente vorgenommen, um die Spezifität der Click-Färbung zu garantieren. Hierfür wurden HEK293T-Zellen zwar mit allen drei Plasmiden transfiziert, jedoch ohne Zugabe von zusätzlichen ncAAs, sodass keine NR1-*Amber*-Expression stattfinden konnte. Dadurch konnte das UAG-Stopcodon nicht unterdrückt werden und führte zum Abbruch der Translation, sodass in den konfokalen Aufnahmen sowohl kein EGFP-Signal als auch kein H-tet-Cy5 Signal erkennbar war (Abbildung 3.14). Ferner wurde bei der Zelltransfektion auf das tRNA^{Pyl}/NESPylRS^{AF}-Plasmid verzichtet, sodass die ncAAs weder an die orthogonale tRNA binden konnten, noch durch die orthogonale RS beladen wurden. Auch hier waren kein EGFP-Signal und kein Click-Signal sichtbar (Daten nicht gezeigt). Bei einer weiteren Kontrolle wurde der NR1-WT unter denselben Färbebedingungen wie oben mit H-tet-Cy5 gefärbt und zeigte ebenso keine NR1-Membranfärbung, da der Farbstoff nicht click-reagieren konnte (Abbildung 3.14). Diese Negativkontrollen deuteten auf eine sehr spezifische NR1-Membranfärbung durch bioorthogonale Click-Färbung mit ncAAs in der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors hin. Zusätzlich wurde die bioorthogonale Click-Färbung durch GCE von NR1 mit kommerzieller indirekter Antikörperfärbung (anti-NR1 AK) verglichen. Hierfür wurden HEK293T wie oben mit allen drei Plasmiden in Anwesenheit von TCO*A transfiziert und anschließend mit einem kommerziellen NR1-Primärantikörper (GluN1 von Alomone Labs) und Alexa Fluor 647 gekoppelten Sekundärantikörper jeweils für 30 Minuten gefärbt. Der kommerzielle GluN1-Antikörper stellte sich als spezifischer heraus als diejenigen kommerziellen NR1-Antikörper, die in Kapitel 3.1 verwendet wurden, da er den extrazellulären Aminoterminus von NR1 im Bereich der Aminosäuren 385 bis 399 bindet und nicht (wie die anderen kommerziellen Antikörper) den transmembranen Bereich.

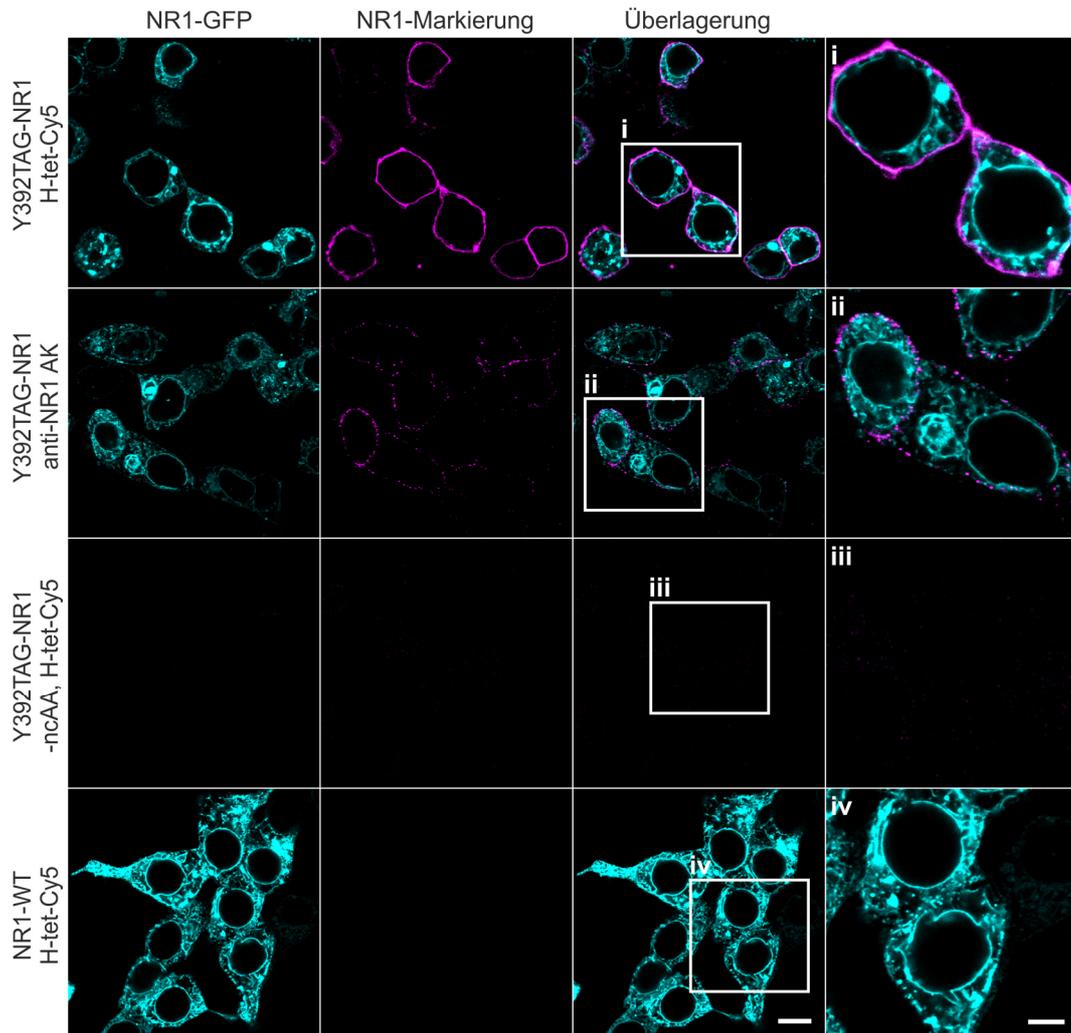


Abbildung 3.14: Spezifität der bioorthogonalen NR1-Click-Färbung durch GCE. Konfokale Bilder von NR1-Membranfärbungen von HEK293T-Zellen, die mit NR1-WT oder NR1-*Amber*-Mutante Y392TAG-NR1 (EGFP-Expression in cyan), NR2B und tRNA^{Pro}/NESPyIRS^{AF} transfiziert wurden. Die Zellen wurden in Anwesenheit oder Abwesenheit (-ncAA) von TCO^{*}A kultiviert und mit 1,5 μ M H-tet-Cy5 (magenta) durch bioorthogonale Click-Färbung oder mit kommerzieller Antikörperfärbung (anti-NR1 AK) und Alexa Fluor 647 gekoppelten Sekundärantikörper (magenta) angefärbt. Die Spezifität der bioorthogonalen Click-Färbung konnte durch die Negativkontrollen (3. und 4. Reihe) belegt werden. Maßstabsbalken entsprechen 10 μ m bzw. 5 μ m in i-iv. Mit Erlaubnis bearbeitet nach Neubert et al. 2018, © 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Trotz alledem zeigte die kommerzielle Antikörperfärbung zwar eine spezifische Färbung innerhalb der Membran, jedoch war das Signal im Gegensatz zur bioorthogonalen Click-Färbung sehr punktuell und fleckig (Abbildung 3.14). Ähnlich fleckige Strukturen des NMDA-Rezeptors wurden in vorherigen Veröffentlichungen in heterologen Expressionssystemen publiziert (Takano et al. 2011; Luo et al. 2002). Dieses Ergebnis zeigte, dass kleine organische Farbstoffe wie H-tet-Cy5 eine bessere Zugänglichkeit zur NR1-Untereinheit haben und damit den Rezeptor besser anfärben können als große Antikörper. IgG-Antikörper konnten ihr Epitop aufgrund ihrer Größe nur schlecht erreichen, da sie möglicherweise von anderen Membrankomponenten sterisch abgeschirmt wurden. Außerdem könnten Antikörper Querverbindungen während des Fixierungsprozesses bilden und dadurch eine NR1-Clusterbildung innerhalb der Membran induzieren.

Nachdem sich die Spezifität und Effizienz der bioorthogonalen Click-Färbung des NMDA-Rezeptors bestätigte, wurden verschiedene H-tet-Cy5 Konzentrationen im Bereich von 30 nM bis 5 μ M getestet, um das Optimum für weitere Experimente zu ermitteln. Hierfür wurden transfizierte HEK293T-Zellen für 10 Minuten mit der jeweiligen Farbstoffkonzentration gefärbt und fixiert. Die bioorthogonalen Click-Färbungen wurden stets auf Eis durchgeführt, um die Zellaktivität einzuschränken und mögliche Internalisierungsprozesse zu verhindern. Konfokale Aufnahmen konnten zeigen, dass sich eine H-tet-Cy5 Konzentration von 1,5 μ M als optimal herausstellte (Abbildung 3.15).

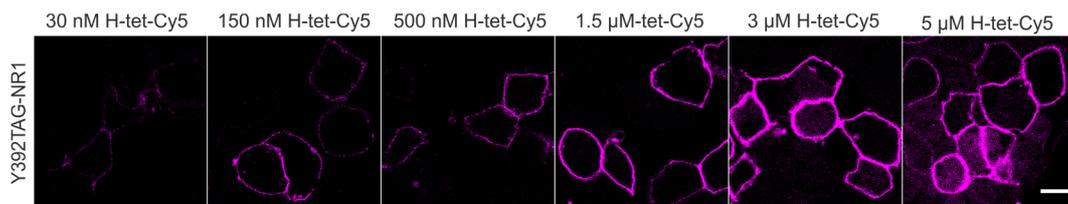


Abbildung 3.15: Titration des Tetrazin-Cy5-Farbstoffs. Konfokale Bilder von NR1-Membranfärbungen in HEK293T-Zellen, die mit Y392TAG-NR1, NR2B und tRNA^{Pyl}/NESPylRS^{AF} in Anwesenheit von TCO*A transfiziert wurden. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von H-tet-Cy5 (magenta) bioorthogonal durch Click-Reaktion gefärbt und fixiert. H-tet-Cy5 Konzentrationen von links nach rechts: 30 nM, 150 nM, 500 nM, 1,5 μ M, 3 μ M, 5 μ M. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m. Mit Erlaubnis bearbeitet nach Neubert et al. 2018, © 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Bioorthogonale NR1-Click-Färbungen wurden zusätzlich in verschiedenen Zelllinien getestet. Dazu wurden HEK293T-Zellen (aus humanen embryonalen Nierenzellen stammend), COS-7-Zellen (aus Nierenzellgewebe einer afrikanischen Meerkatze stammend) und NG108-15-Zellen (Glioblastom-Hybridzellen (Hamprecht 1977)) mit Y392TAG-NR1, NR2B und tRNA^{Pyl}/NESPylRS^{AF} in Anwesenheit von TCO^{*}A transfiziert und mit 1,5 μ M H-tet-Cy5 auf Eis gefärbt. Aufgrund der verschiedenen Zelleigenschaften wie Form, Oberflächenadhäsion und Membranprotrusion wirken die Konfokalbilder unterschiedlich (Abbildung 3.16). Jedoch konnten in allen drei Zelllinien ähnliche Membranfärbungen beobachtet werden. Dabei wiesen HEK293T-Zellen die stabilste Genexpression auf, erkennbar am helleren EGFP- und H-tet-Cy5-Signal.

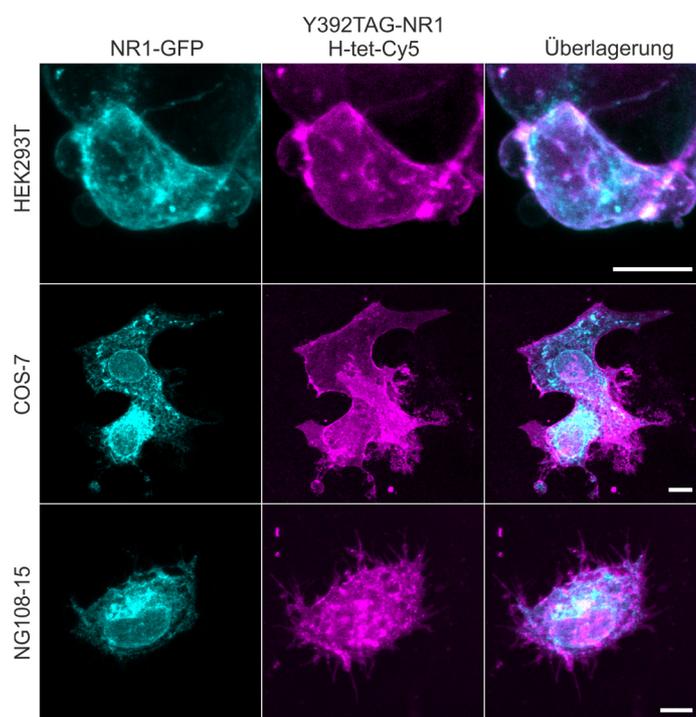


Abbildung 3.16: Spezifität der bioorthogonalen NR1-Click-Färbung in verschiedenen Zelllinien. Konfokale Bilder von HEK293T-, COS-7- und NG108-15-Zellen, die mit Y392TAG-NR1, NR2B und tRNA^{Pyl}/NESPylRS^{AF} in Anwesenheit von TCO^{*}A transfiziert und mit 1,5 μ M H-tet-Cy5 bioorthogonal gefärbt wurden. Alle drei Zelllinien zeigten EGFP-Signal in cyan und H-tet-Cy5 Singal in magenta. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m. Mit Erlaubnis bearbeitet nach Neubert et al. 2018, © 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

3.3.2 Bioorthogonale Click-Markierung mit verschiedenen Farbstoffen

Neben Tetrazin-Cy5 gibt es viele weitere kommerziell erhältliche Tetrazin-Farbstoffe, die sowohl membranpermeabel als auch nicht permeabel sein können. Für eine NMDA-Rezeptor-Membranfärbung werden Farbstoffe benötigt, die die Membran nicht überwinden können. Um anschließende Kofärbungen durchführen zu können, wurde die bioorthogonale Click-Färbung des NMDA-Rezeptors durch GCE mit weiteren clickbaren Tetrazin-Farbstoffen getestet. Dazu wurden HEK293T-Zellen mit Y392TAG-NR1, NR2B und tRNA^{Pyl}/NESPylRS^{AF} in Anwesenheit von TCO*A transfiziert und für 10 Minuten mit 1,5 μM H-tet-ATTO532 bzw. H-tet-Cy3 auf Eis gefärbt. In den konfokalen Aufnahmen konnte auch hier eine homogene Membranfärbung beider Farbstoffe festgestellt werden (Abbildung 3.17 A). Lediglich H-tet-Cy3 zeigte ein schwaches intrazelluläres Signal, was auf eine leichte Membranpermeabilität des Farbstoffs hindeutet, sowohl bei Zellen mit ncAA-Zugabe als auch bei Zellen ohne ncAA-Zugabe (-ncAA) (Abbildung 3.17 A und B). H-tet-ATTO532 wies dagegen ausschließlich Signal in der Zellmembran auf. Die NR1-EGFP-Expression war wiederum sowohl in der Membran als auch innerhalb der Zelle lokalisiert.

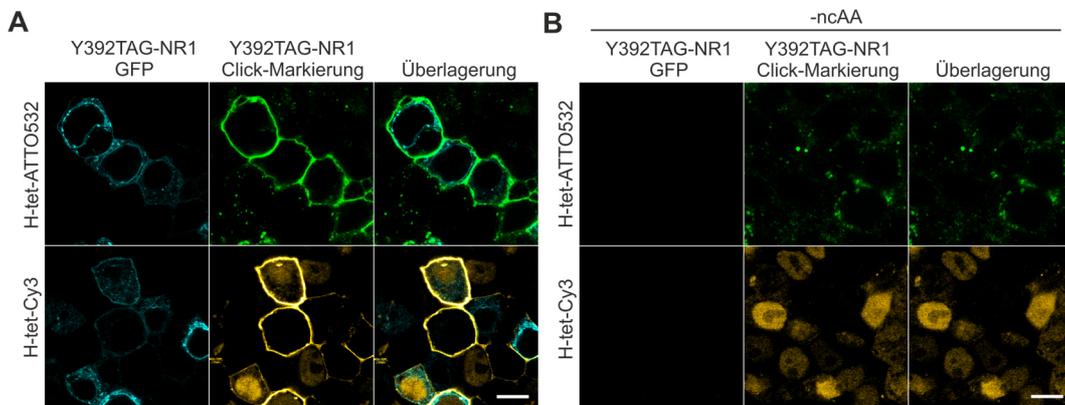


Abbildung 3.17: Bioorthogonale NR1-Click-Färbung mit verschiedenen Tetrazin-Farbstoffen. Konfokale Aufnahmen von HEK293T-Zellen, die mit Y392TAG-NR1, NR2B und tRNA^{Pyl}/NESPylRS^{AF} in Anwesenheit (A) bzw. in Abwesenheit (B, -ncAA) von TCO*A transfiziert wurden. Die Zellen wurden mit 1,5 μM H-tet-ATTO532 (grün) oder 1,5 μM H-tet-Cy3 (gelb) bioorthogonal für 10 Minuten auf Eis gefärbt und fixiert. Das EGFP-Signal ist in cyan angezeigt. Der Kontrast wurde auf die jeweiligen Bedingungen der verschiedenen Bilder angepasst. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 μm . Mit Erlaubnis bearbeitet nach Neubert et al. 2018, © 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

In weiteren Experimenten wurden Kofärbungen mit bioorthogonalen NR1-Click-Färbungen zusammen mit NR1-Antikörperfärbungen durchgeführt. Dabei wurden sowohl der monoklonale rekombinante NR1-Patientenantikörper 007 168 NR1 mAb aus Kapitel 3.1 als auch der kommerzielle NR1-Antikörper (GluN1 von Alomone Labs) getestet. Beide Antikörper erwiesen sich als relativ spezifisch gegen die NR1-Untereinheit, da sie eine der wenigen NR1-Antikörper sind, die die extrazelluläre Region von NR1 binden. Der kommerzielle GluN1-Antikörper bindet sogar das gleiche Epitop wie die Y392TAG-NR1-Click-Mutante (GluN1 AK bindet die Aminosäuren 385 bis 399). HEK293T-Zellen wurden erneut mit allen drei Plasmiden transfiziert (das Y392TAG-NR1-Plasmid enthielt kein EGFP) und zunächst mit bioorthogonaler Click-Reaktion mit 1,5 μ M H-tet-ATTO532 für 10 Minuten auf Eis angefärbt. Anschließend wurde die Immunfluoreszenzfärbung mit entweder dem Primärantikörper 007 168 NR1 mAb oder dem kommerziellen anti-NR1-Antikörper (anti-NR1 Ab) und passendem Sekundärantikörper gekoppelt an Alexa Fluor 647 für jeweils 30 Minuten auf Eis durchgeführt. Konfokale Aufnahmen zeigten erneut ein homogenes Membransignal der NR1-Click-Färbung mit H-tet-ATTO532 (Abbildung 3.18). Dagegen wiesen sowohl der rekombinante monoklonale NR1-Patientenantikörper als auch der kommerzielle NR1-Antikörper wiederholt fleckige Cluster-Signale in der Membran auf. Um sicherzustellen, dass die bioorthogonale Click-Markierung die Antikörper-Epitope nicht blockierte, wurden Antikörperfärbungen allein (ohne zusätzliche Click-Markierung) durchgeführt. Jedoch wurden auch hier (genauso wie in Abbildung 3.14) NR1-Cluster auf der Membran beobachtet. Bei einer weiteren Kontrolle wurde nur mit dem Sekundärantikörper angefärbt, der keinerlei Signal zeigte und somit keine unspezifischen Bindungen aufwies. Die Ergebnisse belegten, dass Kofärbungen mit bioorthogonaler Click-Chemie und Antikörpern möglich sind und beide Markierungen sich gegenseitig sterisch nicht behindern.

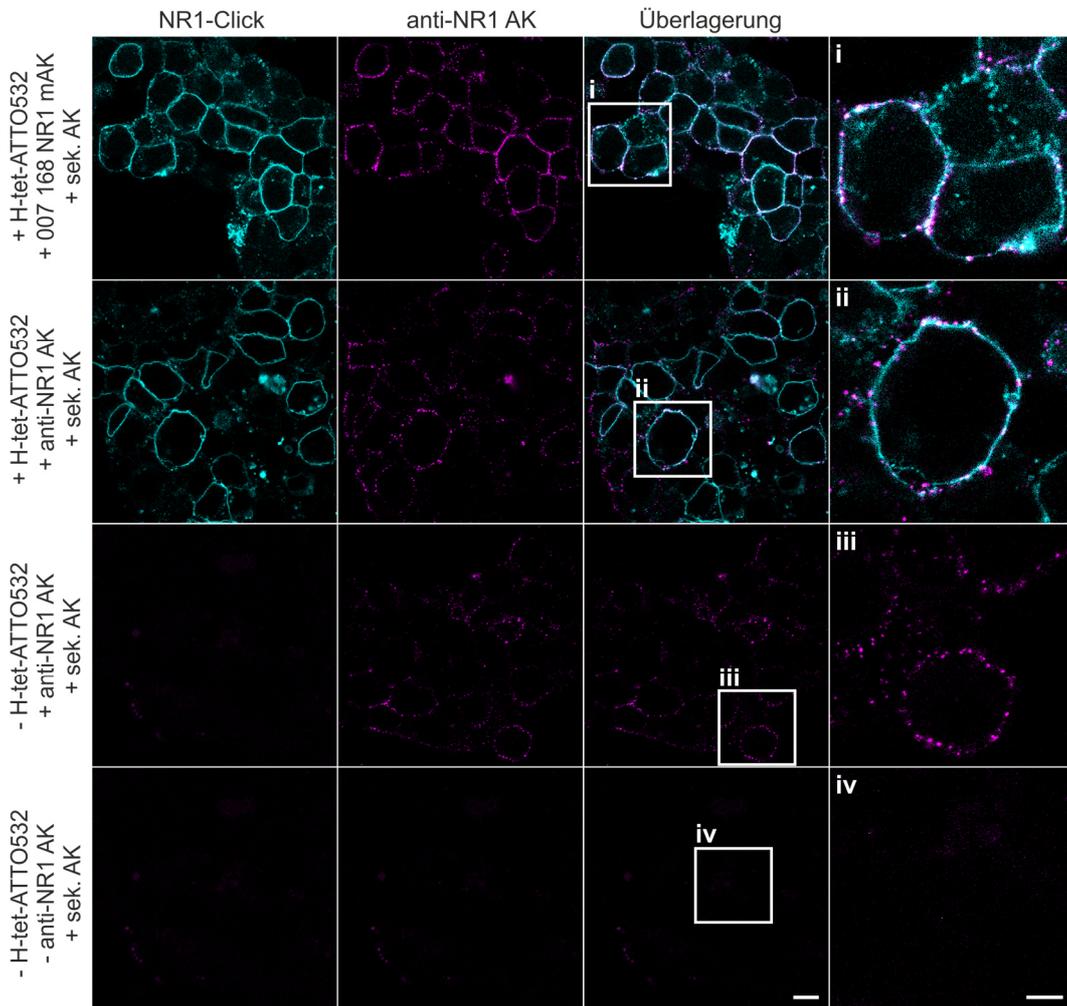


Abbildung 3.18: Kofärbung von NR1 mit bioorthogonaler Click- und Antikörperfärbung. Konfokale Bilder von NR1-Membranfärbungen von HEK293T-Zellen, transfiziert mit Y392TAG-NR1 (ohne EGFP), NR2B und tRNA^{Pyl}/NES^{PylRS}^{AF} in Anwesenheit von TCO^{*}A. Die Zellen wurden zunächst mit 1,5 μ M H-tet-ATTO532 (cyan) für 10 Minuten auf Eis bioorthogonal Click-markiert. Anschließend wurde mit dem primären monoklonalen rekombinanten NR1-Patientenantikörper 007 168 NR1 mAK (+ 007 168 NR1 mAK) bzw. dem kommerziellen anti-NR1-Antikörper (+ anti-NR1 AK) und Alexa Fluor 647 gekoppelten Sekundärantikörper (+ sek. AK) (magenta) jeweils für 30 Minuten auf Eis gefärbt und fixiert. Zum Vergleich wurde die Immunfluoreszenzfärbung ohne die Click-Markierung durchgeführt (3. Reihe). Als Negativkontrolle wurde nur die Sekundärantikörperfärbung durchgeführt (4. Reihe). Die Ergebnisse zeigten, dass die Antikörperfärbung nicht durch die Click-Markierung beeinträchtigt wurde. Maßstabsbalken entsprechen 10 μ m, bzw. 5 μ m in i-iv. Mit Erlaubnis bearbeitet nach Neubert et al. 2018, © 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

3.3.3 Lebendzell-Markierungen und Zellfunktionalität von bioorthogonal geclickten NMDA-Rezeptoren

Damit biologische Strukturen und Prozesse in ihrer natürlichen Umgebung erforscht werden können, ist es notwendig, sie lebend zu untersuchen. Deshalb sollte zunächst geprüft werden, ob die NR1-*Amber*-Mutante dieselben elektrophysiologischen Funktionalitäten aufweist wie der Wildtyp-Rezeptor. Um mögliche Einschränkungen der Rezeptorfunktionalität in der *Amber*-Mutante zu ermitteln, wurden Patch-Clamp-Messungen in der Whole-Cell-Konfiguration vom NR1-Wildtyp und der Y392TAG-NR1-Mutante verglichen. Hierfür wurden NG108-15-Zellen verwendet, da diese ein sehr gut etabliertes Modellsystem für die Elektrophysiologie darstellen. NG108-15-Zellen sind neuronalen Zellen sehr ähnlich und haben die Fähigkeit, selbst komplex designte Membranproteine heterolog zu exprimieren (Kleinlogel et al. 2011). Die Elektrophysiologieversuche wurden von PD Dr. Ulrich Terpitz vom Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik an der Universität Würzburg durchgeführt. In Whole-Cell Patch-Clamp-Experimenten zeigten NR1-WT mit NR2B transfizierte Zellen typische Antworten, die bereits zuvor für NMDA-Rezeptoren beschrieben wurden (Moriguchi et al. 2007; Chao et al. 1997; Zhang et al. 2016; Kawajiri und Dingledine 1993) (Abbildung 3.19 A). In der nicht-aktivierenden (Glutamat-freien) Lösung wurden nur kleine unspezifische Ströme beobachtet, die linear abhängig von der angelegten Spannung waren. Nachdem 1 mM Natriumglutamat zugegeben wurde, kam es zu einer Rezeptoraktivierung, indem die Stromstärke in Abhängigkeit von der angelegten Spannung linear anstieg. Dies zeigte eine intakte NMDA-Rezeptoraktivierung. Als Kontrolle wurde zusätzlich Magnesium in die Aktivierungslösung zugegeben, was eine Blockierung des NMDA-Kanals induzierte (Kawajiri und Dingledine 1993) und somit, bis zu einem Membranpotenzial unter -20 mV, verringerte Ströme gemessen wurden. Darüber hinaus wurden NG108-15-Zellen mit Y392TAG-NR1, NR2B und tRNA^{Pyl}/NESPylRS^{AF} in Anwesenheit von TCO*A transfiziert und unter gleichen Bedingungen wie der Wildtyp gepatcht. Dabei wurden gleiche Strom-Spannungs-Verhältnisse wie beim NR1-Wildtyp gemessen. Dies bedeutet, dass die NR1-*Amber*-Mutante trotz ihrer Punktmutation noch volle Aktivität zeigte (Abbildung 3.19 B). Ferner blieb die charakteristische Magnesiumblockade bis zu einem Membranpotenzial unter -20 mV erhalten. Nicht transfizierte NG108-15-Zellen dienten der Kontrolle und zeigten keinerlei Aktivierung, nachdem Glutamat zugegeben wurde (Abbildung 3.19 C). Dies lässt sich durch die Abwesenheit einer beträchtlichen Menge von intrinsischen NMDA-Rezeptoren in undifferenzierten NG108-15-Zellen erklären. Die Ergebnisse verdeutlichten, dass die

3 Ergebnisse und Diskussion

Y392TAG-*Amber*-Mutante in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften keinerlei Einschränkungen gegenüber dem Wildtyp aufwies. Somit hat die Punktmutation keine Auswirkungen auf die Rezeptorfunktionalität.

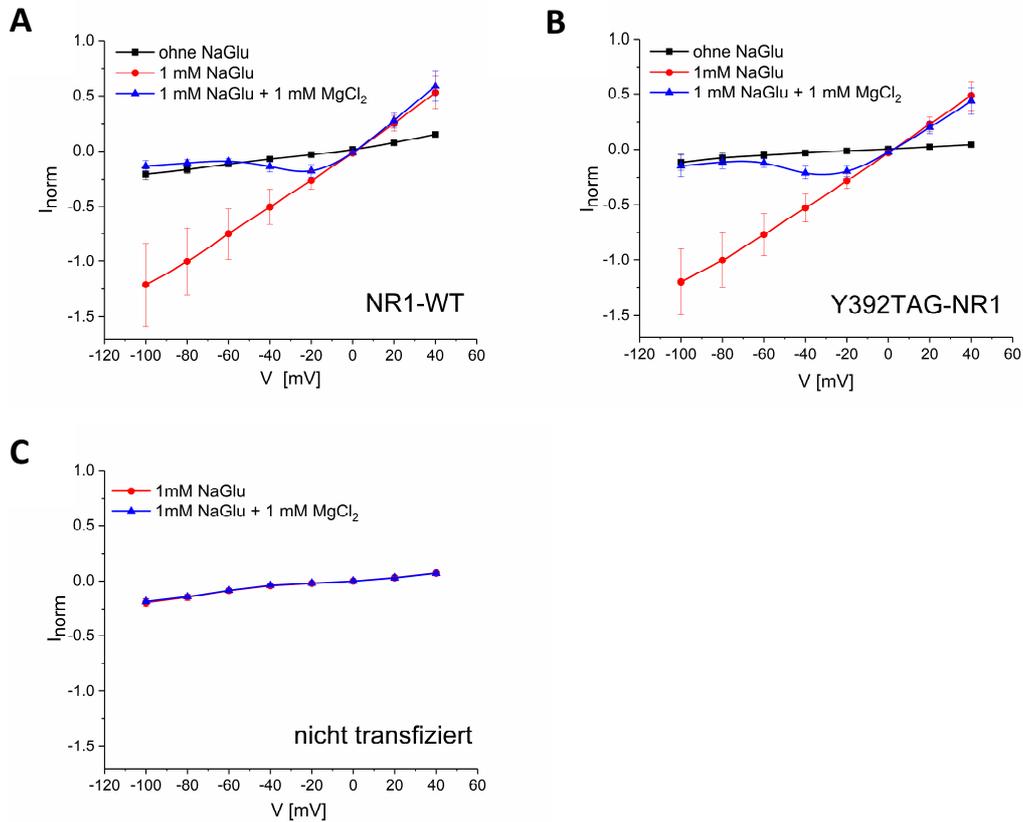


Abbildung 3.19: Rezeptorfunktionalität der Y392TAG-NR1-Mutante in Patch-Clamp-Experimenten. NG108-15-Zellen wurden entweder mit dem NR1-Wildtyp (NR1-WT) und NR2B (A) oder mit Y392TAG-NR1, NR2B und tRNA^{Pyl}/NESPylRS^{AF} in Anwesenheit von TCO^{*}A (B) transfiziert. Mit Hilfe der Whole-Cell Patch-Clamp-Methode wurde das Strom-Spannungs-Verhältnis (I-V-Kurve) der Zellen gemessen. Dabei wurden die physiologischen Lösungen, wie in Glasgow und Johnson 2014 beschrieben, verwendet. Die nicht-aktivierende Lösung war Glutamat-frei (ohne NaGlu, schwarz), während die aktivierende Lösung mit 1 mM Natriumglutamat versetzt wurde (1 mM NaGlu, rot) und somit zur Rezeptoraktivierung führte. Die Anwesenheit von 1 mM Magnesiumchlorid (1 mM NaGlu + 1 mM MgCl₂, blau) diente als Kanalblocker und inhibierte eine Aktivierung bis zu einem Membranpotenzial unter -20 mV. Alle Ströme (I) (Mittelwert \pm Standardfehler von 5 Experimenten mit zwei Aufnahmen) wurden zum Mittelwert der 1 mM Glutamatlösung bei einem Potenzial von -80 mV normalisiert. (C) Die Ströme von untransfizierten Zellen waren unverändert in Anwesenheit (blau) und Abwesenheit (rot) von Magnesiumchlorid in Natriumglutamat. In Zusammenarbeit mit PD Dr. Ulrich Terpitz der Universität Würzburg. Mit Erlaubnis bearbeitet nach Neubert et al. 2018, © 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Bei Lebendzell-Messungen, wie z.B. Patch-Clamp-Analysen, kann es im Laufe der Zeit zu Rezeptorinternalisierungen kommen. Dabei werden Membranrezeptoren von der Zelloberfläche ins Zellinnere zurückgezogen, was zu einer verminderten Rezeptordichte auf der Membran führt und damit einhergehend zu verringertem Membransignal während elektrophysiologischer Experimente. Um herauszufinden, ob Internalisierungsprozesse von exprimierten NMDA-Rezeptoren stattfinden, wurden HEK293T-Zellen mit Y392TAG-NR1, NR2B und $tRNA^{Pyl}/NESPyIRS^{AF}$ in Anwesenheit von TCO*A transfiziert und mit $1,5 \mu M$ H-tet-Cy5 gefärbt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und für 0, 10, 20 bzw. 30 Minuten bei $37 \text{ }^\circ C$ und 5% CO_2 inkubiert, fixiert und am Konfokalmikroskop betrachtet. Dabei konnte eine erhöhte NMDA-Rezeptorinternalisierung in Form von intrazellulären Vesikeln nach 20 – 30 Minuten Inkubation festgestellt werden (Abbildung 3.20). Trotz alledem zeigten Patch-Clamp-Messungen nach deutlich längerer Zellinkubation unveränderte Aktivierungssignale, da sich immer noch genügend NMDA-Rezeptoren in der Membran befanden. Diese Beobachtung bestätigte, dass der Verlust an gefärbten NMDA-Rezeptoren von der Membran ein sehr langsamer Prozess ist und die elektrophysiologischen Experimente nicht beeinflusste.

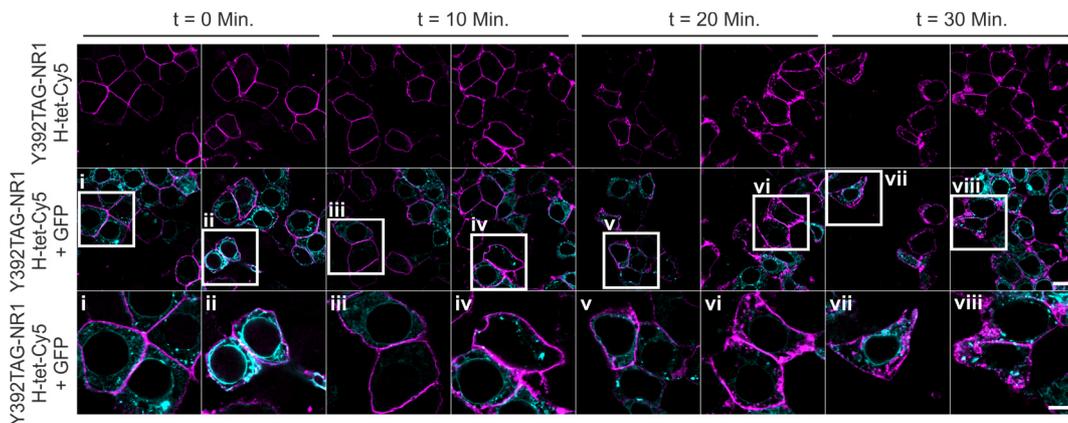


Abbildung 3.20: Internalisierung von NMDA-Rezeptoren. Konfokale Bilder von NR1-Membranfärbungen von HEK293T-Zellen, transfiziert mit Y392TAG-NR1, NR2B und $tRNA^{Pyl}/NESPyIRS^{AF}$ in Anwesenheit von TCO*A. Die Zellen wurden mit $1,5 \mu M$ H-tet-Cy5 (magenta) bioorthogonal gefärbt und anschließend bei $37 \text{ }^\circ C$ für 0, 10, 20 bzw. 30 Minuten in Nährmedium inkubiert und fixiert. Die EGFP-Expression von NR1 ist in cyan abgebildet. In den konfokalen Aufnahmen war nach 20 – 30 Minuten eine erhöhte Anzahl intrazellulärer Vesikel festzustellen. Maßstabsbalken entsprechen $10 \mu m$, bzw. $5 \mu m$ in i-viii. Mit Erlaubnis bearbeitet nach Neubert et al. 2018, © 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Zusätzlich wurde die Mobilität von geclückten NMDA-Rezeptoren in lebenden Zellen durch FRAP-Messungen (engl. *fluorescence recovery after photobleaching*) ermittelt. Bei der FRAP-Methode werden Fluoreszenz-markierte Proteine an einem bestimmten Bereich der Probe mit sehr hoher Laserleistung irreversibel gebleicht. Durch diese Photobleichung der Fluorophore entsteht ein „schwarzer Fleck“ in der Zellmembran, in den erst langsam die Moleküle aus der unmittelbaren Umgebung eindiffundieren und somit die Fluoreszenz wieder herstellen. Durch die Messung des Verlaufs der Fluoreszenzintensitäten lassen sich somit die Diffusionszeiten der Moleküle bestimmen. In dieser Arbeit wurden transient transfizierte HEK293T-Zellen, die das Y392TAG-NR1-*Amber*-Konstrukt mit bzw. ohne EGFP exprimierten, bioorthogonal mit 1,5 μM H-tet-Cy5 angefärbt. Anschließend wurden die FRAP-Experimente an lebenden Zellen am Konfokalmikroskop durchgeführt (Abbildung 3.21). Dazu wurde zunächst ein Startbild aufgenommen und drei verschiedene Regionen definiert: Region 1 wurde mit der maximalen Laserintensität der entsprechenden Wellenlänge gebleicht (rot), Region 2 wurde als Referenz festgelegt und nicht gebleicht (gelb), in Region 3 wurde das Hintergrundsignal gemessen (blau). Nach Starten des Experiments wurde die festgelegte Region 1 gebleicht und anschließend weitere 100 Bilder aufgenommen, aus denen im Nachhinein die Halbwertszeit der Fluoreszenz-Wiederherstellung und der mobile Anteil berechnet wurden. Sowohl die EGFP-*Amber*-Mutante als auch die EGFP-freie-*Amber*-Mutante wiesen eine identische Mobilität mit den Halbwertszeiten von $5,4 \pm 0,6$ Sekunden bzw. $5,4 \pm 0,8$ Sekunden auf. Die dazugehörigen ermittelten Werte der mobilen Fraktionen waren $64 \pm 5 \%$ bzw. $74 \pm 5 \%$. Dabei wurde der Mittelwert \pm Standardfehler von 24 Messungen der EGFP-*Amber*-Mutante und 5 Messungen der EGFP-freien-*Amber*-Mutante ermittelt. Das zusätzlich exprimierte EGFP schien die Mobilität der NMDA-Rezeptoren also nicht zu beeinflussen. Im Gegensatz dazu konnte in transfizierten HEK293T-Zellen, die mit dem kommerziellen NR1-Antikörper (GluN1 von Alomone Labs) angefärbt wurden, keinerlei Rezeptormobilität beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die NR1-Antikörperfärbung wies wiederum fleckige Cluster auf. Möglicherweise hielten die Antikörper die Rezeptoren in der Membran zusammen und clusterten diese, sodass sie keine Möglichkeit hatten, sich weiterhin frei zu bewegen.

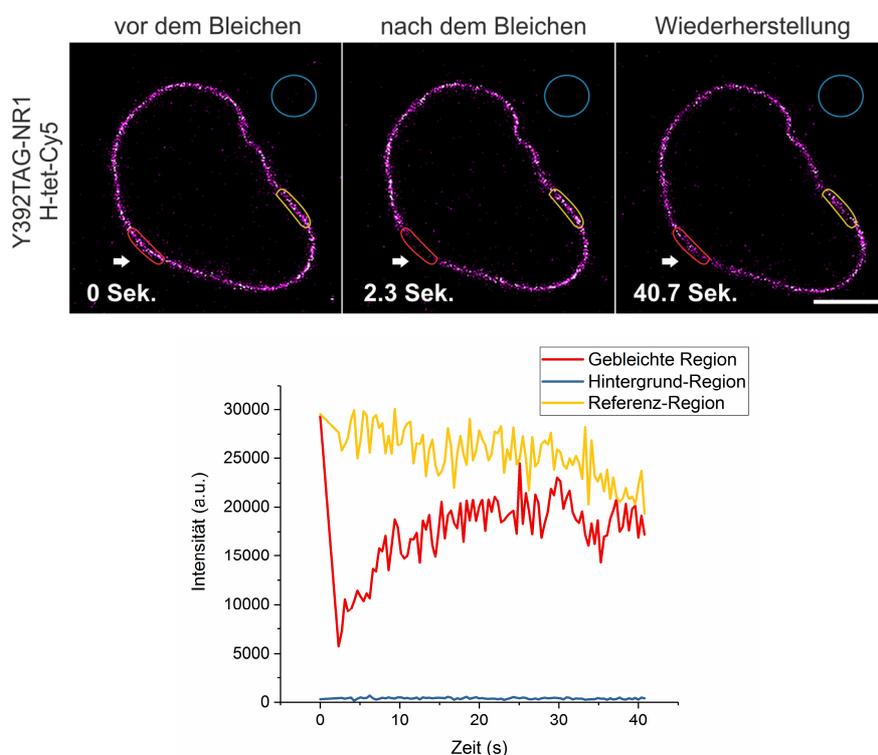


Abbildung 3.21: FRAP-Messungen des bioorthogonal geklickten NMDA-Rezeptors. HEK293T-Zellen wurden mit Y392TAG-NR1, NR2B und $tRNA^{Pyl}/NESPyIRS^{AF}$ in Anwesenheit von TCO^{*}A transfiziert und mit $1,5 \mu\text{M}$ H-tet-Cy5 (magenta) bioorthogonal Click-markiert. Die obere Abbildung zeigt konfokale Bilder einer lebenden Zelle während der FRAP-Messung: vor dem Bleichen (links), unmittelbar nach dem Bleichen (Mitte) und nach der Wiederherstellung der Fluoreszenz (rechts). Für die Ermittlung der Halbwertszeit der wiederhergestellten Fluoreszenz wurden folgende Regionen festgelegt: gebleichte Region (rot), nicht-gebleichte Referenz-Region (gelb) und Hintergrundsignal (blau). Der Maßstabsbalken entspricht $5 \mu\text{m}$. Die dazugehörigen Signale der Fluoreszenzintensität wurden im unteren Graphen beispielhaft für ein Experiment abgebildet. Mit Erlaubnis bearbeitet nach Neubert et al. 2018, © 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

3.3.4 Hochaufgelöste bioorthogonal geklickte NMDA-Rezeptoren

Nachdem die Spezifität und Vitalität der bioorthogonalen Click-Methode durch GCE bewiesen wurden, konnte der NMDA-Rezeptor schließlich mit hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie-Experimenten durch *d*STORM visualisiert werden. Der Farbstoff Alexa Fluor 647 und der strukturell ähnliche Cyanin-Farbstoff Cy5 haben sich aufgrund ihrer Photostabilität, Helligkeit und ihres geeigneten Blinkverhaltens als ideale Fluorophore für *d*STORM herausgestellt (van de Linde et al. 2011; van de Linde und Sauer 2014). Folglich ermöglicht die bioorthogonale Click-Markierung durch GCE mit Tetrazin-Cy5-Farbstoffen optimale *d*STORM-Bedingungen. Weitere sehr große Vorteile der Click-Methode durch GCE sind die Ortsspezifität und Stöchiometrie. Somit trägt jede NR1-Untereinheit nur ein einziges Cy5-Fluorophor, sodass mit Hilfe hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie quantitative Analysen durchgeführt werden können. Für die *d*STORM-Experimente wurden HEK293T-Zellen erneut mit Y392TAG-NR1, NR2B und tRNA^{Pyl}/NESPyIRS^{AF} in Anwesenheit von TCO*A transfiziert und nachfolgend mit H-tet-Cy5 gefärbt. Um den Cy5-Farbstoff zum Blinken zu bringen, wurde die Probe mit 100 mM MEA-Puffer (pH-Wert 7,6 – 8,0) versetzt und mit einer Laserleistung des 641 nm-Lasers von 200 mW bestrahlt. NMDA-Rezeptoren wurden schließlich durch die angefärbte NR1-Untereinheit auf der basalen (durch TIRF-Beleuchtung) oder äquatorialen (durch EPI-Beleuchtung) Membran gemessen, indem 30 000 Bilder aufgenommen wurden (Abbildung 3.22 oben). Sowohl im basalen als auch im äquatorialen Bereich der Membran konnten homogen verteilte Rezeptoren beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurden transfizierte HEK293T-Zellen zusätzlich mit dem kommerziellen anti-NR1-Antikörper (GluN1 von Alomone Labs) und dem Alexa Fluor 647 gekoppelten Sekundärantikörper angefärbt. Hier bestätigten sich die vorherigen konfokalen Aufnahmen, indem NR1-Cluster vorwiegend ungleichmäßig auf der basalen und äquatorialen Membran verteilt waren (Abbildung 3.22 unten). Außerdem zeigte die bioorthogonale NR1-Click-Färbung eine höhere Rezeptordichte auf der Membran als die Färbung mit Antikörpern. Möglicherweise induzierte der Sekundärantikörper die Clusterbildung während der indirekten Immunfärbung. Zukünftige Experimente sollten mit einem Fluorophor-gekoppelten NR1-Primärantikörper durchgeführt werden, um herauszufinden, ob trotzdem eine Clusterbildung ausgelöst wird.

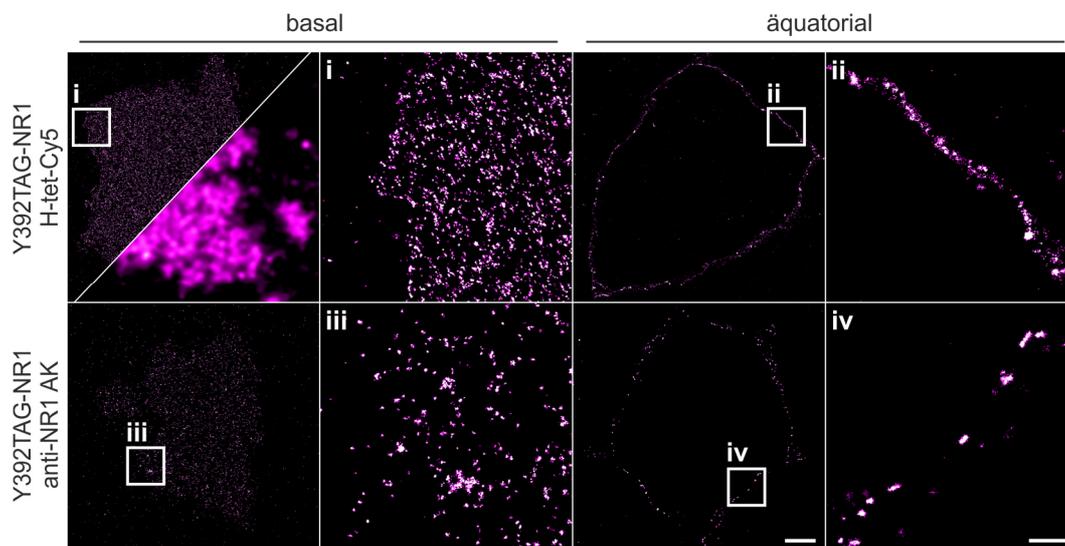


Abbildung 3.22: Hochauflöste NMDA-Rezeptoren mit bioorthogonaler Click- bzw. Anti-körperfärbung markiert. *d*STORM-Aufnahmen von NR1-Membranfärbungen von HEK293T-Zellen, transfiziert mit Y392TAG-NR1, NR2B und tRNA^{PyI}/NESPyIRS^{AF} in Anwesenheit von TCO^{*A} und anschließender Click-Färbung mit 1,5 μ M H-tet-Cy5 für 10 Minuten auf Eis (obere Abbildungen). Transfizierte HEK293T-Zellen wurden außerdem mit kommerzieller indirekter anti-NR1-Antikörperfärbung markiert (Alexa Fluor 647 gekoppelter Sekundärantikörper) (untere Abbildungen). NR1 wurde in basalen (TIRF-Modus) und äquatorialen (EPI-Modus) Regionen der Zelle aufgenommen. Dabei wurde eine Lokalisationspräzision von 9 nm, 17 nm, 8 nm und 16 nm in den Bildern i-iv ermittelt. Die untere Ecke des oberen linken Bildes zeigt das zugehörige klassische Weitfeld-Fluoreszenzbild. Maßstabsbalken entsprechen 2,5 μ m, bzw. 0,5 μ m in i-iv. Mit Erlaubnis bearbeitet nach Neubert et al. 2018, © 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Zusammenfassend gesagt entwickelten wir eine Methode, um die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors ortsspezifisch durch die Erweiterung des eukaryotischen genetischen Codes mit Click-Chemie anzufärben. Aus einer Auswahl mehrerer NR1-*Amber*-Mutanten identifizierten wir eine, die besonders effektiv anzufärben war. Diese Y392TAG-NR1-Mutante wurde erfolgreich zum Färben des NMDA-Rezeptors sowohl für die Konfokalmikroskopie als auch für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie mit *d*STORM verwendet. Die NR1-Untereinheit konnte in verschiedenen Zelllinien und sogar mit unterschiedlichen Click-Farbstoffen angefärbt werden. Außerdem wurde die bioorthogonale Click-Färbung mit der konventionellen Immunfluoreszenzfärbung verglichen, mit dem Resultat, dass die Vorteile der bioorthogonalen Click-Färbung aufgrund deren Effizienz und Spezifität überwiegen. Obwohl der kommerzielle Antikörper

dasselbe Epitop bindet wie der Cy5-Tetrazin-Farbstoff, waren die Membranfärbungen höchst unterschiedlich. So wies die Antikörperfärbung fleckige NR1-Cluster auf, dagegen konnte eine sehr homogene Rezeptorfärbung durch Click-Färbung erreicht werden. Weiterhin konnte eine vollständige Rezeptorfunktionalität der NR1-*Amber*-Mutante mit Hilfe von Patch-Clamp-Experimenten festgestellt werden. Dabei wiesen der Wildtyp-Rezeptor und die NR1-*Amber*-Mutante keine Unterschiede in der Rezeptoraktivität auf.

4 Fazit und Ausblick

Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis ist nur eine von vielen Erkrankungen, deren Ursache noch nicht erforscht ist und über deren molekularer Zusammenhänge wir noch nicht genügend wissen, um die Patienten effektiv behandeln zu können. Dies verlangt weitere Grundlagenforschung, bei der wir kleinste Proteine und sogar einzelne Moleküle untersuchen und visualisieren müssen, um sie zu verstehen. Seit der Überwindung der Beugungsgrenze Anfang der 1990-er Jahre ist es möglich, mit Hilfe verschiedener hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie-Methoden einzelne Rezeptoren, Proteine oder Moleküle sichtbar zu machen. Diese Techniken sind sehr sensitiv und verlangen besonders sorgfältige Probenpräparation. Mit *d*STORM beispielsweise kann eine maximale Auflösung von bis zu 20 nm erreicht werden. Da die Fähigkeit, biologische Strukturen aufzulösen, jedoch nicht nur von der optischen Auflösung abhängt, sondern ebenso von der Markierungsgröße und -dichte, besteht weiterhin das große Bedürfnis, effiziente Markierungsmethoden zu nutzen. Kleinere Markierungen haben den großen Vorteil, dass sie die Auflösung nicht beeinflussen und außerdem die natürlichen Eigenschaften und Funktionen der Proteine innerhalb der Zelle weniger beeinträchtigen als große Farbstoffe. In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Markierungsmethoden für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie getestet, um verschiedene postsynaptische Proteine sichtbar zu machen: Antikörperfärbung, Super-Binde-Peptidfärbung und bioorthogonale Click-Färbung durch die Erweiterung des eukaryotischen genetischen Codes.

Antikörperfärbung. Antikörper sind mit einer Größe von 10 – 15 nm verhältnismäßig groß. Bei einer indirekten Immunfärbung, bei der ein Fluorophormarkierter Sekundärantikörper an den Epitop-spezifischen Primärantikörper bindet, kann der Abstand von Zielprotein und Fluorophor bis zu 30 nm betragen. Sobald mehrere Sekundärantikörper an einen Primärantikörper binden, kann der Komplex umso größer werden. Dies bedeutet unter Umständen eine Auflösungsverminderung. Jedoch gibt es oftmals keine alternativen Markierungsmethoden,

aufgrund schlechter Transfektionseffizienz des Zielproteins oder keiner Verfügbarkeit gleichwertiger kommerzieller Produkte. Im ersten Teil der Doktorarbeit wurde deshalb die Antikörperfärbung genutzt, um NMDA-Rezeptoren anzufärben. Hierbei war die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors von besonderem Interesse, da diese bei der Autoimmunerkrankung Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis eine entscheidende Rolle spielt. Patienten dieser Erkrankung bilden Autoantikörper gegen die NR1-Untereinheit, wodurch eine Rezeptorinternalisierung verursacht wird. Dies bewirkt einen schnellen reversiblen Verlust der NMDA-Rezeptoren auf der Postsynapse, was wiederum zu psychiatrischen und neurologischen Störungen der Patienten führen kann. Mit Hilfe der drei verschiedenen Mikroskopiemethoden Konfokalmikroskopie, SIM und *d*STORM wurde die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors sowohl in primären Neuronen als auch in Gehirnschnitten mit diversen Antikörpern angefärbt. Das Markerprotein Homer wurde zusätzlich mittels indirekter Immunfärbung markiert, um die postsynaptische Region sichtbar zu machen. Untersuchungen mit allen drei Mikroskopiemethoden zeigten, dass kommerziell erhältliche NR1-Antikörper sowohl in primären Neuronen als auch in Gehirnschnitten keine spezifischen Färbungen erzielten. Wahrscheinlich lag diese Unspezifität an der Epitoperkennung der kommerziellen NR1-Antikörper. Die Hersteller dieser Antikörper deklarieren den großen Epitopbereich der Aminosäuren 660 bis 811, welcher sich innerhalb der Ligand-Binde-Domäne (LBD) und der transmembranen Domäne (TMD) des Rezeptors befindet. Möglicherweise waren diese Bereiche schlecht zugänglich für einen Antikörper mit einer Größe von ~ 10 nm, was eine ineffiziente Bindung erklären könnte. Daraufhin wurden isolierte IgG-Antikörper von Patienten mit Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis (Patienten AK) getestet, die freundlicherweise von Prof. Dr. med. Christian Geis von der Hans-Berger-Klinik für Neurologie in Jena zur Verfügung gestellt wurden. Jedoch konnten auch diese keine guten Immunfärbungen liefern. Bei der Aufreinigung wurde der gesamte IgG-Antikörperpool aus dem Plasmapheresematerial des Patienten isoliert, sodass möglicherweise weitere, sich im Plasma befindenden IgG-Antikörper zu unspezifischen Bindungen führten. Außerdem könnte der Patient einen geringen Titer an pathogenen NR1-Autoantikörpern aufgewiesen haben, sodass trotz Verwendung einer hohen Antikörperkonzentration kaum NR1 angefärbt werden konnte. Infolgedessen wurden rekombinante monoklonale NR1-Patientenantikörper erprobt, die freundlicherweise von PD Dr. med. Harald Prüß von der Klinik für Neurologie und experimenteller Neurologie der Charité in Berlin zur Verfügung gestellt wurden. Diese wurden aus einzelnen Antikörper-produzierenden Zellen (B-Gedächtniszellen und Antikörper-sekretierenden Zellen) aus dem Liquor der Patienten isoliert und mit Hilfe molekularbiologischer Methoden rekombinant in HEK293T-Zellen

hergestellt. Rekombinante monoklonale NR1-Patientenantikörper hatten den Vorteil, dass sie nur ein einziges Epitop (N368/G369) auf der aminoterminalen Domäne (ATD) gebunden haben (Kreye et al. 2016). Tatsächlich stellten sich beide rekombinante monoklonale NR1-Patientenantikörper 003 102 NR1 mAK und 007 168 NR1 mAK als sehr spezifisch heraus und lieferten gute Kollokalisierungen mit Homer sowohl in Neuronen als auch in Gehirnschnitten. Mit Hilfe hochauflösender *d*STORM-Messungen wurden Clusteranalysen in Gehirnschnittfärbungen durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass der 007 168 NR1 mAK, im Gegensatz zu allen anderen rekombinanten monoklonalen NR1-Patientenantikörpern, eine höhere Lokalisationsdichte sowohl innerhalb als auch außerhalb der Homer-Cluster aufwies. Somit konnte gezeigt werden, dass sich synaptische und extrasynaptische NMDA-Rezeptoren mit Hilfe des 007 168 NR1 mAK am besten anfärben ließen.

Indirekte Antikörperfärbungen haben den Nachteil, dass sie keine stöchiometrischen Markierungen darstellen, da oftmals mehrere Sekundärantikörper an einen Primärantikörper binden können. Somit können erhöhte Lokalisationen an Rezeptoren auftreten, an denen zufällig zwei oder mehrere Sekundärantikörper gebunden haben, im Gegensatz zu Rezeptoren, an denen zufällig nur ein einziger Sekundärantikörper gebunden hat. Um zukünftig verbesserte quantitative Analysen zu erreichen, sollten die rekombinanten monoklonalen NR1-Patientenantikörper direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden, sodass auf den Sekundärantikörper verzichtet werden kann. Sekundärantikörper könnten außerdem nachteilig sein, indem sie möglicherweise eine artifizielle Clusterbildung induzieren und somit die natürliche Verteilung der Zielproteine nicht korrekt darstellen könnten (Baumgart et al. 2016). Bei Zwei-Farben *d*STORM muss darüber hinaus beachtet werden, dass im grünen Kanal meist weniger Photonen detektiert werden können als im roten Kanal. Obwohl sich Alexa Fluor 532 als ein zuverlässiger Farbstoff im grünen Spektrum erwiesen hat, sind dessen photophysikalische Eigenschaften, wie beispielsweise das Blinkverhalten, trotzdem nicht so reproduzierbar, wie die vom roten Farbstoff Alexa Fluor 647. Aus diesem Grund wurden die NMDA-Rezeptoren stets mit dem roten Farbstoff Alexa Fluor 647 und die größeren Homer-Cluster mit Alexa Fluor 532 angefärbt.

Um die Auswirkungen der Autoantikörper während der Krankheit Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis zu erforschen, sollten in zukünftigen Experimenten sowohl primäre Neuronen als auch Mäuse mit verschiedenen Patientenantikörpern für einen bestimmten Zeitraum behandelt werden. Die behandelten Neuronen bzw. Mausgehirne könnten anschließend mit Hilfe des rekombinanten monoklonalen NR1-Patientenantikörpers zusammen mit Homer angefärbt und hochaufgelöst

mit *d*STORM analysiert werden. Möglicherweise kann somit eine exakte NMDA-Rezeptor-Abnahme innerhalb der Synapse ermittelt werden und mit unbehandelten Neuronen bzw. Mausgehirnschnitten verglichen werden. Ladépêche et al. konnten bereits mit Hilfe von STORM in Neuronen zeigen, dass die Organisation der NMDA-Rezeptor-Cluster innerhalb der Synapse durch Autoantikörper von Patienten mit Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis gestört wird (Ladépêche et al. 2018). Sie konnten eine NMDA-Rezeptor-Abnahme innerhalb der Synapse feststellen. Nach intrathekaler Antikörperapplikation müsste dies zukünftig ebenso in Gehirnschnitten belegt werden.

Super-Binde-Peptidfärbung. Peptide sind mit einer Größe von $\sim 2,5$ nm wesentlich kleiner als Antikörper und wurden aufgrund dessen als weitere Markierungsmöglichkeit für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie in dieser Arbeit verwendet. Dr. Hans M. Maric et al. entwickelten ein Verfahren, um kompakte hochaffin bindende Peptide, sog. „Super-Binde-Peptide“ (SBPs) herzustellen (Maric et al. 2017). Eine Mikrochip-Technologie ermöglichte es, eine Vielzahl modifizierter Proteine gleichzeitig zu testen und mit weiteren Eigenschaften zu versehen. So konnte beispielsweise die Bindeaffinität und Membranpermeabilität des Peptids verbessert werden, ebenso wie die Kopplung an einen variablen Fluoreszenzfarbstoff. Dr. Hans M. Maric vom Rudolf-Virchow-Zentrum für experimentelle Biomedizin der Universität Würzburg stellte somit ein kleines, hochspezifisches und effektiv bindendes Peptid für das postsynaptische Ankerprotein Gephyrin her, das aminoterminal an den Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodamin (TMR) gebunden ist (TMR-2i). Das Zielprotein Gephyrin ist für das Clustern und Verankern der beiden inhibitorischen GABA_A- und Glycin-Rezeptoren (GlyR) auf der Postsynapse verantwortlich, indem es sie mit dem Cytoskelett verbindet. Folglich bestimmt Gephyrin deren Lokalisation innerhalb der Postsynapse. Im zweiten Abschnitt der Doktorarbeit konnte das neue TMR-gekoppelte Super-Binde-Peptid „TMR-2i“ als hochaffiner effektiver Marker für das Ankerprotein Gephyrin mit Hilfe von SIM nachgewiesen werden. Sowohl in DIV14 als auch in DIV21 primären Neuronen kolokalisierte das TMR-2i Peptid mit dem inhibitorischen präsynaptischen vesikulären GABA-Transporter VGAT, jedoch nicht mit dem excitatorischen präsynaptische Glutamattransporter VGLUT1. Gegenüber kommerzieller indirekter Gephyrin-Antikörperfärbung konnten SBPs eine dichtere Gephyrin-Färbung und bessere Clusterrepräsentation zeigen, da deren Größe unterhalb der SIM-Auflösung war. In unseren Versuchen wurden Kolokalisationsanalysen durchgeführt, bei denen Gephyrin mit SBPs markiert wurde, wohingegen VGAT bzw. VGLUT1 mit indirekter Antikörperfärbung angefärbt

wurden. Somit wurden zwei verschiedene Markierungsmethoden simultan angewandt und analysiert. Da bei der indirekten Antikörperfärbung das Fluorophor mit einem Abstand von bis zu 30 nm vom Target entfernt sein kann, ist davon auszugehen, dass die VGAT- bzw. VGLUT1-Antikörperfärbung schlechter aufgelöst wurde als die Färbung mit den $\sim 2,5$ nm kleinen SBPs. Außerdem könnte es bei Antikörperfärbungen zur Signalverstärkung kommen, indem mehrere Sekundärantikörper an einen Primärantikörper binden. Dadurch sind die Signalintensitäten der Antikörperfärbung nicht vergleichbar mit denen der SBP-Färbung. Damit zukünftig korrektere Kollokalisationsanalysen realisiert werden können, sollten zusätzliche SBPs von VGAT bzw. VGLUT1 entwickelt werden, um diese schließlich zusammen mit den Gephyrin-SBPs anfärben und vergleichen zu können.

SBPs haben den großen Vorteil, dass sie aufgrund ihrer erhöhten Bindungsaffinitäten sehr spezifisch an ihr Zielprotein binden können und somit eine sehr gute Markierungsalternative zu Antikörpern darstellen. Außerdem ist die Färbung mit Peptiden praktisch sehr einfach und schnell durchführbar, da die SBPs direkt an einen Farbstoff gekoppelt sind und somit keinen zusätzlichen Inkubationsschritt der Fluoreszenzzugabe benötigen, wie beispielsweise die Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörpers bei der indirekten Immunfärbung. Außerdem müssen SBPs aufgrund ihrer hohen Bindeaffinitäten in nur sehr geringen Färbekonzentrationen (2 nM) eingesetzt werden und benötigen überdies sehr kurze Inkubationszeiten von nur 13 Minuten. Komplexe indirekte Antikörperfärbungen benötigen dagegen höhere Konzentrationen und sind zeitaufwendiger, da Primär- und Sekundärantikörper Inkubationszeiten von jeweils ca. 1 Stunde verlangen. Dies kann wiederum für potenzielle Lebendzellmessungen nachteilig sein. Sowohl bei Antikörper- als auch bei Peptidfärbungen müssen unspezifische Bindestellen zunächst mit bestimmten Blocklösungen abgeblockt werden, um anschließend eine spezifische Targetbindung zu erhalten. Für die SBP-Färbung stellte sich heraus, dass das Blocken mit dem ungelabelten Kontrollpeptid 2j zu spezifischeren Färbungen und besseren SIM-Bildern führte. Die Herstellung der SBPs ist zwar sehr aufwendig und benötigt moderne Mikrochip-Technologien, jedoch sind SBPs aufgrund ihrer Größe bestens für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie wie *d*STORM geeignet. In zukünftigen Experimenten müssten also ebenso blinkende Farbstoffe, wie z.B. Alexa Fluor 647, an SBPs gekoppelt werden, um diese schließlich für *d*STORM nutzen zu können. So könnten beispielsweise Gephyrin oder auch weitere neuronale Proteine sowohl in Neuronen als auch in Gehirnschnitten mit kleinen hochaffinen SBPs angefärbt werden und mit Hilfe von *d*STORM bis zu 20 nm aufgelöst werden. Zusammen-

fassend gesagt sind SBPs sehr gute Marker für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie aufgrund ihrer Größe, Stabilität, erhöhten Affinität und Spezifität. Mit Hilfe von SBPs kann ein stöchiometrisches Markieren des Zielproteins erfolgen, sodass Quantifizierungsanalysen realisiert werden können. Durch weitere Modifikationen könnten SBPs überdies sowohl für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie als auch für klinische Applikationen optimiert werden, wie z.B. durch Affinitätsverbesserung, Selektivität, das Einfügen unnatürlicher Aminosäuren und weiterer chemischer Modifikationen.

Bioorthogonale Click-Färbung durch GCE. Im letzten Abschnitt dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, um die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors ortsspezifisch mit organischen Fluorophoren mittels bioorthogonaler Click-Färbung durch GCE anzufärben. Organische Fluorophore sind mit einer Größe von 0,5 – 2 nm noch kleiner als Peptide und damit optimal für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie geeignet. Durch die Erweiterung des genetischen Codes konnte die unnatürliche, nicht-kanonische Aminosäure (ncAA) *trans*-Cycloocten (TCO^{*}A) in die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors eingebaut werden und anschließend hochspezifisch mit Hilfe der Click-Chemie mit organischen Tetrazin-Farbstoffen angefärbt werden. Bei der Click-Reaktion wird eine kovalente Bindung zwischen der ncAA im Zielprotein und dem organischen Fluorophor geschaffen, sodass sich der gebundene Farbstoff nicht mehr von der ncAA lösen kann. Dies hat den Vorteil, dass die gebundene Click-Markierung mit keinen weiteren zellulären Komponenten kreuzreagieren kann und somit die natürlichen Prozesse der Zelle kaum beeinflusst. In dieser Doktorarbeit stellte sich aus einer Reihe von sieben verschiedenen Click-Mutanten der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors die Y392TAG-NR1-Mutante als diejenige mit der besten Expression und effektivsten H-tet-Cy5-Click-Markierung heraus. Somit war es zum ersten Mal möglich, die NR1-Untereinheit des tetrameren synaptischen NMDA-Rezeptors bioorthogonal mit einem Tetrazin-Farbstoff zu klicken. Die Expression dreier verschiedener Vektoren (Y392TAG-NR1, NR2B, tRNA^{Pyl}/NESPyIRS^{AF}) gleichzeitig innerhalb der Zelle war eine große Herausforderung. Um einen funktionalen NMDA-Rezeptor in der Zellmembran zu erhalten, war die Koexpression mit der NR2B-Untereinheit notwendig (Akashi et al. 2009; Kumar 2015). Zusätzlich mussten die orthogonale tRNA und deren zugehörige orthogonale Aminoacyl-tRNA-Synthetase (RS) auf einem weiteren Plasmid (tRNA^{Pyl}/NESPyIRS^{AF}) in die Zelle transfiziert werden. Mit der Transfektion des dritten TAG-NR1-Plasmids war die Zelle einem gewissen Stress ausgesetzt, was sich in den Transfektionseffizienzen widerspiegeln kann. Durch Austesten verschiedener DNA-Konzentrationen

und Inkubationszeiten konnte jedoch eine sehr gute Transfektionseffizienz erreicht werden. Überdies wurde durch Titration des Click-Farbstoffs H-tet-Cy5 die optimale Farbstoffkonzentration von $1,5 \mu\text{M}$ ermittelt, um ideale NR1-Membranfärbungen, sogar mit verschiedenen Tetrazin-Farbstoffen (H-tet-ATTO532 und H-tet-Cy3), zu erhalten. Beliu et al. zeigten ebenso, dass die Cytoskelettkomponenten Aktin und Mikrotubulin mit vielen verschiedenen Tetrazin-Farbstoffen (wie z.B. Me-tet-ATTO488, Me-tet-ATTO532, Me-tet-TAMRA, Me-tet-AZ503, Me-tet-ATTO700) durch bioorthogonale Click-Färbung angefärbt werden konnten (Beliu et al. 2019). Die GCE-Technologie ermöglicht es somit, zelluläre Zielproteine mit vielen verschiedenen kommerziell erhältlichen Tetrazin-Farbstoff-Konjugaten anzufärben und für die verschiedensten mikroskopischen Anwendungen zu nutzen. Darüber hinaus waren NMDA-Rezeptor-Kofärbungen durch bioorthogonale Click-Färbungen zusammen mit NR1-Antikörperfärbungen möglich. Zukünftige Kofärbungen könnten ebenso mit zwei, zu unterschiedlichen Zeitpunkten eingebauten ncAAs erfolgen. Dabei wird eine ncAA mit Hilfe der SPAAC-Click-Reaktion und die andere ncAA durch die SPIEDAC-Click-Reaktion angefärbt (Nikić und Lemke 2015). Damit allerdings zwei unterschiedliche Zielproteine gleichzeitig angefärbt werden können, müssten zwei ncAAs mit Hilfe zwei verschiedener Stopcodons eingebaut werden. Da jedoch die Anzahl an *Nonsense*-Codons begrenzt ist, werden oft sog. Quadruplett-Codons verwendet. Diese bestehen aus vier aufeinander folgenden Basen und werden von einer tRNA mit einem Quadruplett-Anticodon eingebaut, sodass ein +1 Frameshift während der Translation verursacht wird (Anderson et al. 2004; Hohsaka et al. 1996; Wang et al. 2012). Dies hat den Vorteil, dass kein zusätzliches Stopcodon für den Einbau einer ncAA verwendet werden muss. In dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass die bioorthogonale NR1-Click-Färbung durch GCE in verschiedenen Zelllinien (HEK293T-, COS-7- und NG108-15-Zellen) funktionierte, wobei alle drei eine gute Membranfärbung aufwiesen. Darüber hinaus zeigten Whole-Cell Patch-Clamp-Experimente keinerlei Einflüsse auf die Rezeptorfunktionalität der Y392TAG-NR1 exprimierenden Zellen. Folglich konnten keine elektrophysiologischen Unterschiede zwischen der NR1-*Amber*-Mutante und dem Wildtyp-Rezeptor festgestellt werden, was besonders für weitere Lebendzell-Untersuchungen von großem Vorteil war. Somit konnte belegt werden, dass die natürlichen physiologischen Eigenschaften der modifizierten Rezeptoren nicht beeinflusst wurden. In weiteren FRAP-Lebendzell-Messungen konnten Dynamik und Mobilität der bioorthogonal geklickten NMDA-Rezeptoren nachgewiesen werden. Dies zeigte zusätzlich, dass die Rezeptoren durch deren Markierung nicht in ihrer Funktionalität beeinflusst wurden. Zukünftig sollte die Mobilität von NMDA-Rezeptoren gemessen werden, die mit direkt konjugierten

kommerziellen bzw. Patienten-NR1-Antikörpern angefärbt wurden. Daraufhin könnte deren Mobilität mit derjenigen von bioorthogonal geklickten NMDA-Rezeptoren verglichen werden. Nach einer Inkubationszeit von 20 – 30 Minuten konnten natürliche Internalisierungsprozesse der bioorthogonal gefärbten NMDA-Rezeptoren in lebenden HEK293T-Zellen beobachtet werden. NMDA-Rezeptoren sind dafür bekannt, dass sie relativ langsam internalisiert werden ($\sim 5\%$ der NMDA-Rezeptoren innerhalb von 30 Minuten) und im Gegensatz zu AMPA-Rezeptoren sehr stabil in der Zellmembran lokalisiert sind (Nong et al. 2004). AMPA-Rezeptoren wechseln dagegen ständig zwischen intrazellulärer und membranständiger Lokalisation und weisen dadurch eine erheblich höhere Internalisierungsrate von $\sim 15 - 20\%$ innerhalb von 30 Minuten auf (Nong et al. 2004; Roche et al. 2001). Schlussendlich konnte die Y392TAG-NR1-Mutante erfolgreich für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie verwendet werden und lieferte in *d*STORM-Messungen effiziente homogene Membranfärbungen. Dabei war der Tetrazin-Cy5-Farbstoff aufgrund seiner Größe, Photostabilität, Helligkeit und seines geeigneten Blinkverhaltens, ähnlich wie Alexa Fluor 647, ideal für *d*STORM geeignet. Im Gegensatz zur homogenen bioorthogonalen NR1-Click-Färbung durch GCE wiesen kommerzielle NR1-Antikörperfärbungen ungleichmäßig verteilte Cluster innerhalb der Membran auf. Dies war sowohl in Konfokalmikroskopie- als auch in *d*STORM-Messungen erkennbar und zeigte, dass kleine organische Farbstoffe wie H-tet-Cy5 eine deutlich bessere Zugänglichkeit zur NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors haben und dadurch den Rezeptor besser anfärben als große Antikörper. Möglicherweise induzierten Antikörper eine Clusterbildung des Rezeptors.

Die Ortsspezifität der bioorthogonalen Click-Markierung erlaubt außerdem, in Kombination mit der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie, quantitative Analysen, z.B. indem heteromere Rezeptoren sichtbar gemacht werden. Da an jeder der zwei NR1-Untereinheiten des NMDA-Rezeptors nur ein einziger Cy5-Farbstoff binden kann, könnte somit die Stöchiometrie des Rezeptors ermittelt werden. Mit Hilfe einer Titrationsreihe des H-tet-Cy5-Farbstoffs könnte man auf die Anzahl der NR1-Untereinheiten innerhalb des Rezeptors statistisch schließen und herausfinden, wie viele NR1-Dimere bzw. NR1-Monomere sich durchschnittlich auf einer Zellmembran befinden. Bei einer geringen Cy5-Konzentration werden verhältnismäßig weniger NR1-Untereinheiten auf der Zellmembran angefärbt, sodass nur selten ein Doppelsignal des Cy5-Farbstoffs (immer dann, wenn zwei NR1-Untereinheiten im Rezeptor angefärbt wurden) auftritt. Sobald die Farbstoffkonzentration erhöht wird, sollte es zu verhältnismäßig mehr Cy5-Doppelsignalen kommen, da die Wahrscheinlichkeit höher ist, dass beide NR1-Untereinheiten im Rezeptor gleichzeitig angefärbt werden, vorausgesetzt man

geht von NR1-Dimeren aus. Eine weitere Methode zur Rezeptor-Stöchiometrie-Bestimmung ist die Doppelfärbung. Dabei wird die NR1-Untereinheit mit zwei verschiedenen Click-Farbstoffen mit jeweils den gleichen, möglichst sättigenden Konzentrationen angefärbt, z.B. H-tet-Cy5 und H-tet-ATTO532. Die Wahrscheinlichkeitsverteilung gibt schließlich vier verschiedene Möglichkeiten vor, wie zwei verschiedene Farbstoffe an einen NMDA-Rezeptor binden können, wenn vorausgesetzt wird, dass, wie in der Literatur beschrieben, der NMDA-Rezeptor aus zwei NR1-Untereinheiten besteht: grün + rot, rot + grün, grün + grün und rot + rot. Somit sollten 50 % der Rezeptoren eine rot-grün Markierung aufweisen, sodass eine Kolo-kalisation beider ermittelt werden kann. Durch das hohe Auflösungsvermögen der *d*STORM-Methode sollte diese Stöchiometriebestimmung durchführbar sein. Dies wurde bereits in einigen Vorexperimenten getestet. Jedoch konnten bisher keinerlei Dimere, weder mit der Titrations- noch mit der Doppelfärbemethode, analysiert werden. Unklar ist ebenso, ob durch die Doppelfärbemethode beide Farbstoffe (H-tet-Cy5 und H-tet-ATTO532) gleich gut klicken und die NR1-Untereinheit identisch anfärben. Ein weiteres Problem ist das schlechtere Blinkverhalten des grünen Farbstoffs (im Gegensatz zum roten Farbstoff) während der *d*STORM-Messung mit zwei Farben. Um die Stöchiometrie des NMDA-Rezeptors durch bioorthogonale Click-Färbung durch GCE mit Hilfe von *d*STORM weiterhin zu untersuchen, müssten weitere Experimente durchgeführt werden und dabei verschiedene Tetrazin-Farbstoffe und deren Konzentrationen geprüft werden.

Zusätzlich wurden einige Vorexperimente zur Einzelpartikelverfolgung (engl. *Single-particle-tracking*, SPT) des bioorthogonal geklickten NMDA-Rezeptors durchgeführt. SPT erlaubt die Verfolgung einzelner markierter Moleküle innerhalb einer Zelle mit Hilfe von TIRF-Fluoreszenzmikroskopie und deren anschließende Brown'sche Molekularbewegungsquantifizierung (Manzo und Garcia-Parajo 2015; Shen et al. 2017). Die bioorthogonale Click-Färbung durch GCE sollte hierfür eine ideale Färbemethode darstellen, da die Markierung mit organischen Fluorophoren sehr klein ist und damit die natürlichen Prozesse und Bewegungen des Rezeptors in der Zelle kaum beeinflusst. Außerdem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Lebendzell-Experimente mit einer bioorthogonalen Click-Markierung sehr erfolgreich waren, wie beispielsweise in den FRAP-Messungen. Für SPT ist es besonders wichtig einen sehr hellen, nicht blinkenden Farbstoff zu verwenden, um ihn so lange wie möglich über die Zeit verfolgen zu können. Aus diesem Grund wurde ein Me-tet-SeTau647-Farbstoff in einer sehr geringen Konzentration (1 nM) verwendet. In den Vorexperimenten konnten zwar einzelne NMDA-Rezeptoren durch SPT mit Hilfe einer TIRF-Beleuchtung auf der Zellmembran verfolgt werden, jedoch nur für sehr kurze Zeit. Damit die Vitalität der Zellen im Laufe der SPT-Messung erhalten bleibt, müssten zukünftige

Messungen bei 37 °C ablaufen. Zusätzlich müssten störende Hintergrundsignale vermindert werden. Erst kürzlich konnten König und Sorkin et al. erfolgreich bioorthogonal geklickte Membranproteine mittels SPT in lebenden Zellen verfolgen (König et al. 2019). Sie konnten quantitative Dynamikanalysen des EGF-Rezeptors (engl. *epidermal growth factor receptor*) und des Shaker-B-Kaliumkanals durchführen.

Weitere zukünftige experimentelle Fortschritte sollten in der Expression und bioorthogonalen Click-Färbung durch GCE von mutierten NMDA-Rezeptoren in primären Neuronen gemacht werden. Somit könnten Rezeptorexpression, Transport, Einzelpartikelverfolgung, Internalisierung und Abbau in neuronalen Zellen und Gewebe näher untersucht werden. Dies würde zum ersten Mal die Möglichkeit schaffen, die Funktion und Pathologie der NMDA-Rezeptoren mit sehr hoher Sensitivität und Präzision in ihrer natürlichen Umgebung zu erforschen. Zhu und Riou et al. konnten bereits zeigen, dass es möglich ist, NMDA-Rezeptoren mit einer UAA-Stopcodon-Mutation in hippocampalen Neuronen zu exprimieren, jedoch nicht so stark wie in HEK-Zellen (Zhu et al. 2014). Es ist derzeit immer noch schwierig geeignete Transfektionsprotokolle zu finden, um primäre Neuronen mit mehreren Plasmiden zu transfizieren. Mit Hilfe von Adeno-assoziierten viralen (AAV) Vektoren gelang bereits das Einbringen unnatürlicher Aminosäuren in primäre cortikale Neuronen, Gehirnschnitten und sogar in Mäusen, indem jeweils zwei AAV-Vektoren, für die tRNA mit RS und das Zielprotein mit einem *Amber*-Codon, transfiziert wurden (Ernst et al. 2016). Dies ist ein weiterer Schritt, der in zukünftigen Experimenten getestet werden muss. Obwohl die Methode der bioorthogonalen Click-Färbung durch GCE durch eine Zelltransfektion und Proteinüberexpression limitiert ist, wird sie für alle hochauflösenden Bildgebungs- und Tracking-Anwendungen des NMDA-Rezeptors, bei denen die räumliche Auflösung oder die Markierungseffizienz durch große Markierungen begrenzt ist, nützlich sein.

Für jedes Zielprotein sollte die effizienteste Markierungsmöglichkeit individuell bestimmt werden, abhängig davon, welche Mikroskopiemethode gewählt wird. Oftmals sind Antikörperfärbungen der einfachste Weg, da diese kommerziell für sehr viele Targets erhältlich sind und nicht, wie z.B. Super-Binde-Peptide, relativ aufwendig hergestellt werden müssen. Jedoch sind die Spezifitäten kommerzieller Antikörper oft nicht sehr hoch, wie am Beispiel des NMDA-Rezeptors in dieser Arbeit gezeigt wurde. Für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie sind Antikörperkomplexe, bestehend aus primärem und sekundärem Antikörper, mit einer Größe von bis zu 30 nm sehr groß. Somit ist der Versatz zwischen Zielmolekül

und Farbstoff verhältnismäßig groß, wodurch es zu einer Auflösungsverminderung kommen kann. Super-Binde-Peptide sind dagegen mit einer Größe von $\sim 2,5$ nm deutlich kleiner und wurden so entwickelt, dass sie eine erhöhte Spezifität zu ihrem Zielprotein aufweisen, was sie wesentlich attraktiver für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie macht. Nachteilig ist allerdings deren aufwendiger Herstellungsprozess, der nicht in jedem Labor selbst durchführbar ist. Zunächst müssen thermodynamische und strukturelle Analysen zur Ermittlung der Konsensussequenz vom Zielprotein und dessen Interaktionspartner durchgeführt werden. Zusätzlich werden moderne Mikrochip-Technologien benötigt, um viele modifizierte Peptide gleichzeitig zu analysieren und schlussendlich das spezifischste Peptid auszuwählen. Organische Fluorophore sind mit einer Größe von $0,5 - 2$ nm noch kleiner als SBPs und können durch die Methode der bioorthogonalen Click-Chemie durch GCE ihr Zielprotein sehr spezifisch anfärben. Die Färbung verläuft durch die Click-Reaktion sehr schnell und ist durch die entstandene kovalente Bindung zwischen unnatürlicher Aminosäure im Zielprotein und dem Click-Farbstoff sehr spezifisch. Darüber hinaus können sehr viele verschiedene Tetrazin-Farbstoffe für die unterschiedlichsten mikroskopischen Anwendungen verwendet werden. Jedoch weist auch diese Markierungsmethode einige Nachteile auf. So muss das anzufärbende Zielprotein zuvor genetisch manipuliert werden, indem eine *Amber*-Punktmutation ins Genom eingebracht wird. Darüber hinaus müssen Zellen mit der Fremd-DNA transfiziert werden. Die Überexpression der eingebrachten Fremd-DNA spiegelt nicht die natürlichen physiologischen Zellbedingungen wider. Es ist anzunehmen, dass die Zelle das Einbringen fremder DNA nicht immer toleriert. Somit hat jede Markierungsmethode ihre Vor- und Nachteile, sodass jeweils die geeignetste Markierung des gewünschten Zielmoleküls in Betracht gezogen werden sollte.

Abkürzungsverzeichnis

AF	Alexa Fluor
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
AMPAR	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid Rezeptor
AS	Aminosäure
ATD	Aminoterninale Domäne
BAPTA	1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
BSA	Bovines Serumalbumin
CA	Cornu Amonis
CDC42	Cell division control protein 42
COS-7-Zellen	Nierenzellen aus einer afrikanischen Meerkatze
CTD	Carboxyterminale Domäne
DBSCAN	Density-based spatial clustering of applications with noise
ddH₂O	Bidestilliertes Wasser
DG	Gyrus dentatus
DIV	Days <i>in vitro</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dSTORM	<i>direct</i> stochastic optical reconstruction microscopy
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
EMCCD	Electron multiplying charge-coupled device
EPI	Weitfeld Beleuchtung
FA	Formaldehyd
FAB	Antigen binding fragment
FCS	Fetales Kälberserum
FP	Fluoreszierendes Protein

FRAP	Fluorescence Recovery after Photobleaching
FWHM	Halbwertsbreite einer Gaußverteilung
GA	Glutaraldehyd
GABA	γ -aminobutyric acid
GABA_AR	γ -aminobutyric acid type A Rezeptor
GABARAP	GABA _A receptor-associated protein
GFP	Green fluorescent protein
GlyR	Glycin-Rezeptor
HBSS	Hank's Balanced Salt solution
HEK293T-Zellen	Humane embryonale Nierenzellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HILO	Highly inclined and laminated optical sheet
IC	Innere Umwandlung (engl. <i>Internal Conversion</i>)
IgG	Immunglobulin G
ISC	Interkombinationsübergänge (engl. <i>Intersystem Crossing</i>)
LBD	Ligand-Binde-Domäne
MEA	β -Mercaptoethylamin (Cysteamine)
NA	Numerische Apertur
NaCl	Natriumchlorid
ncAA	Nicht-kanonische Aminosäure (engl. <i>non-canonical amino acid</i>)
NG108-15-Zellen	Glioblastom-Hybridzellen
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor
PA-FP	Photoaktivierbares fluoreszierendes Protein
PALM	Photoactivatable localization microscopy
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDL	Poly-D-Lysin
PFA	Paraformaldehyd
PSD-95	Postsynaptic density protein 95
PSF	Punktspreizfunktion
R	Schwingungsrelaxation
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
RS	Aminoacyl-tRNA-Synthetase
RT	Raumtemperatur

S₁	Niedrigster Singulett-Zustand
SBP	Super-Binde-Peptid
sCMOS	Scientific complemetary metal-oxide-semiconductor
SEM	Standardfehler
SIM	Structured illumination microscopy
SMLM	Single molecule localization microscopy
SPAAC	Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition
SPIEDAC	Strain-promoted inverse-electron-demand Diels-Alder cycloaddition
SPT	Einzelpartikelverfolgung (engl. <i>Single-particle-tracking</i>)
STED	Stimulated emission depletion
STORM	Stochastic optical reconstruction microscopy
T₁	Niedrigster Triplett-Zustand
TCO*A	Trans-Cyclooct-2-en-L-Lysin
TIRF	Total internal reflection fluorescence microscopy
TMR	Tetramethylrhodamin

Publikationen

Diese Doktorarbeit basiert auf folgende Publikationen:

1. Maric, Hans Michael; Hausrat, Torben Johann; Neubert, Franziska; Dalby, Nils Ole; Dose, Sören; Sauer, Markus; Kneussel, Matthias; Strømgaard, Kristian. (2017): Gephyrin-binding peptides visualize postsynaptic sites and modulate neurotransmission. In: *Nature chemical biology* 13 (2), S. 153–160. DOI: 10.1038/nchembio.2246.
2. Neubert, Franziska; Beliu, Gerti; Terpitz, Ulrich; Werner, Christian; Geis, Christian; Sauer, Markus; Dose, Sören (2018): Bioorthogonal Click Chemistry Enables Site-specific Fluorescence Labeling of Functional NMDA Receptors for Super-Resolution Imaging. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 57 (50), S. 16364–16369. DOI: 10.1002/anie.201808951.

Literaturverzeichnis

- Aarts, Michelle; Liu, Yitao; Liu, Lidong; Besshoh, Shintaro; Arundine, Mark; Gurd, James W.; Wang, Yu-Tian; Salter, Michael W.; Tymianski, Michael (2002): Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor-PSD-95 protein interactions. In: *Science (New York, N.Y.)* 298 (5594), S. 846–850. DOI: 10.1126/science.1072873.
- Abbe, E. (1873): Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. In: *Archiv f. mikrosk. Anatomie* 9 (1), S. 413–418. DOI: 10.1007/BF02956173.
- Agard, Nicholas J.; Prescher, Jennifer A.; Bertozzi, Carolyn R. (2004): A strain-promoted 3 + 2 azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems. In: *Journal of the American Chemical Society* 126 (46), S. 15046–15047. DOI: 10.1021/ja044996f.
- Akashi, Kaori; Kakizaki, Toshikazu; Kamiya, Haruyuki; Fukaya, Masahiro; Yamasaki, Miwako; Abe, Manabu; Natsume, Rie; Watanabe, Masahiko; Sakimura, Kenji (2009): NMDA receptor GluN2B (GluR epsilon 2/NR2B) subunit is crucial for channel function, postsynaptic macromolecular organization, and actin cytoskeleton at hippocampal CA3 synapses. In: *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 29 (35), S. 10869–10882. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5531-08.2009.
- Ances, Beau M.; Vitaliani, Roberta; Taylor, Robert A.; Liebeskind, David S.; Voloschin, Alfredo; Houghton, David J.; Galetta, Steven L.; Dichter, Marc; Alavi, Abass; Rosenfeld, Myrna R.; Dalmau, Josep (2005): Treatment-responsive limbic encephalitis identified by neuropil antibodies. MRI and PET correlates. In: *Brain: a journal of neurology* 128 (Pt 8), S. 1764–1777. DOI: 10.1093/brain/awh526.
- Anderson, J. Christopher; Wu, Ning; Santoro, Stephen W.; Lakshman, Vishva; King, David S.; Schultz, Peter G. (2004): An expanded genetic code with a functional quadruplet codon. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (20), S. 7566–7571. DOI: 10.1073/pnas.0401517101.

- Axelrod, D. (2001): Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 2 (11), S. 764–774.
- Bach, Anders; Clausen, Bettina H.; Møller, Magda; Vestergaard, Bente; Chi, Celestine N.; Round, Adam; Sørensen, Pernille L.; Nissen, Klaus B.; Kastrup, Jette S.; Gajhede, Michael; Jemth, Per; Kristensen, Anders S.; Lundström, Patrik; Lambertsen, Kate L.; Strømgaard, Kristian (2012): A high-affinity, dimeric inhibitor of PSD-95 bivalently interacts with PDZ1-2 and protects against ischemic brain damage. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (9), S. 3317–3322. DOI: 10.1073/pnas.1113761109.
- Bach, Anders; Stuhr-Hansen, Nicolai; Thorsen, Thor S.; Bork, Nicolai; Moreira, Irina S.; Frydenvang, Karla; Padrah, Shahrokh; Christensen, S. B.; Madsen, Kenneth L.; Weinstein, Harel; Gether, Ulrik; Strømgaard, Kristian (2010): Structure-activity relationships of a small-molecule inhibitor of the PDZ domain of PICK1. In: *Organic & biomolecular chemistry* 8 (19), S. 4281–4288. DOI: 10.1039/c0ob00025f.
- Bates, Mark; Huang, Bo; Dempsey, Graham T.; Zhuang, Xiaowei (2007): Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes. In: *Science (New York, N.Y.)* 317 (5845), S. 1749–1753. DOI: 10.1126/science.1146598.
- Baumgart, Florian; Arnold, Andreas M.; Leskovar, Konrad; Staszek, Kaj; Fölser, Martin; Weghuber, Julian; Stockinger, Hannes; Schütz, Gerhard J. (2016): Varying label density allows artifact-free analysis of membrane-protein nanoclusters. In: *Nature methods* 13 (8), S. 661–664. DOI: 10.1038/nmeth.3897.
- Beliu, Gerti; Kurz, Andreas J.; Kuhlemann, Alexander C.; Behringer-Pliess, Lisa; Meub, Mara; Wolf, Natalia; Seibel, Jürgen; Shi, Zhen-Dan; Schnermann, Martin; Grimm, Jonathan B.; Lavis, Luke D.; Doose, Sören; Sauer, Markus (2019): Bioorthogonal labeling with tetrazine-dyes for super-resolution microscopy. In: *Commun Biol* 2 (1), S. 7478. DOI: 10.1038/s42003-019-0518-z.
- Betzig, Eric; Patterson, George H.; Sougrat, Rachid; Lindwasser, O. Wolf; Olenych, Scott; Bonifacino, Juan S.; Davidson, Michael W.; Lippincott-Schwartz, Jennifer; Hess, Harald F. (2006): Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. In: *Science (New York, N.Y.)* 313 (5793), S. 1642–1645. DOI: 10.1126/science.1127344.

- Böck, A.; Forchhammer, K.; Heider, J.; Leinfelder, W.; Sawers, G.; Veprek, B.; Zinoni, F. (1991): Selenocysteine. The 21st amino acid. In: *Mol Microbiol* 5 (3), S. 515–520. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1991.tb00722.x.
- Butler, M. H.; Hayashi, A.; Ohkoshi, N.; Villmann, C.; Becker, C. M.; Feng, G.; de Camilli, P.; Solimena, M. (2000): Autoimmunity to gephyrin in Stiff-Man syndrome. In: *Neuron* 26 (2), S. 307–312.
- Chao, J.; Seiler, N.; Renault, J.; Kashiwagi, K.; Masuko, T.; Igarashi, K.; Williams, K. (1997): N1-dansyl-spermine and N1-(n-octanesulfonyl)-spermine, novel glutamate receptor antagonists. Block and permeation of N-methyl-D-aspartate receptors. In: *Molecular pharmacology* 51 (5), S. 861–871.
- Ciabarra, A. M.; Sullivan, J. M.; Gahn, L. G.; Pecht, G.; Heinemann, S.; Sevarino, K. A. (1995): Cloning and characterization of chi-1. A developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family. In: *J. Neurosci.* 15 (10), S. 6498–6508. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.15-10-06498.1995.
- Cook, Douglas J.; Teves, Lucy; Tymianski, Michael (2012): Treatment of stroke with a PSD-95 inhibitor in the gyrencephalic primate brain. In: *Nature* 483 (7388), S. 213–217. DOI: 10.1038/nature10841.
- Craig, Ann Marie; Banker, Gary; Chang, Weiru; McGrath, Maureen E.; Serpinskaya, Anna S. (1996): Clustering of Gephyrin at GABAergic but Not Glutamatergic Synapses in Cultured Rat Hippocampal Neurons. In: *J. Neurosci.* 16 (10), S. 3166–3177. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.16-10-03166.1996.
- Dalmau, Josep; Armangué, Thais; Planagumà, Jesús; Radosevic, Marija; Mannara, Francesco; Leyboldt, Frank; Geis, Christian; Lancaster, Eric; Titulaer, Maarten J.; Rosenfeld, Myrna R.; Graus, Francesc (2019): An update on anti-NMDA receptor encephalitis for neurologists and psychiatrists. Mechanisms and models. In: *The Lancet Neurology*. DOI: 10.1016/S1474-4422(19)30244-3.
- Dalmau, Josep; Geis, Christian; Graus, Francesc (2017): Autoantibodies to Synaptic Receptors and Neuronal Cell Surface Proteins in Autoimmune Diseases of the Central Nervous System. In: *Physiological reviews* 97 (2), S. 839–887. DOI: 10.1152/physrev.00010.2016.
- Dalmau, Josep; Gleichman, Amy J.; Hughes, Ethan G.; Rossi, Jeffrey E.; Peng, Xiaoyu; Lai, Meizan; Dessain, Scott K.; Rosenfeld, Myrna R.; Balice-Gordon, Rita; Lynch, David R. (2008): Anti-NMDA-receptor encephalitis. Case series and analysis of the effects of antibodies. In: *The Lancet Neurology* 7 (12), S. 1091–1098. DOI: 10.1016/S1474-4422(08)70224-2.

- Dalmau, Josep; Lancaster, Eric; Martinez-Hernandez, Eugenia; Rosenfeld, Myrna R.; Balice-Gordon, Rita (2011): Clinical experience and laboratory investigations in patients with anti-NMDAR encephalitis. In: *The Lancet Neurology* 10 (1), S. 63–74. DOI: 10.1016/S1474-4422(10)70253-2.
- Dalmau, Josep; Tüzün, Erdem; Wu, Hai-yan; Masjuan, Jaime; Rossi, Jeffrey E.; Voloschin, Alfredo; Baehring, Joachim; Shimazaki, M. Haruo; Koide, Reiji; King, Dale; Mason, Warren; Sansing, Lauren H.; Dichter, Marc A.; Rosenfeld, Myrna R.; Lynch, David R. (2007): Paraneoplastic anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis associated with ovarian teratoma. In: *Annals of neurology* 61 (1), S. 25–36. DOI: 10.1002/ana.21050.
- Dalva, M. B.; Takasu, M. A.; Lin, M. Z.; Shamah, S. M.; Hu, L.; Gale, N. W.; Greenberg, M. E. (2000): EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation. In: *Cell* 103 (6), S. 945–956.
- Danglot, Lydia; Triller, Antoine; Bessis, Alain (2003): Association of gephyrin with synaptic and extrasynaptic GABA_A receptors varies during development in cultured hippocampal neurons. In: *Molecular and Cellular Neuroscience* 23 (2), S. 264–278. DOI: 10.1016/S1044-7431(03)00069-1.
- Dani, Adish; Huang, Bo; Bergan, Joseph; Dulac, Catherine; Zhuang, Xiaowei (2010): Superresolution imaging of chemical synapses in the brain. In: *Neuron* 68 (5), S. 843–856. DOI: 10.1016/j.neuron.2010.11.021.
- Dingledine, R.; Borges, K.; Bowie, D.; Traynelis, S. F. (1999): The glutamate receptor ion channels. In: *Pharmacological reviews* 51 (1), S. 7–61.
- Dommerholt, Jan; Rutjes, Floris P. J. T.; van Delft, Floris L. (2016): Strain-Promoted 1,3-Dipolar Cycloaddition of Cycloalkynes and Organic Azides. In: *Topics in current chemistry (Cham)* 374 (2), S. 16. DOI: 10.1007/s41061-016-0016-4.
- Dong, Xiao-xia; Wang, Yan; Qin, Zheng-hong (2009): Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. In: *Acta pharmacologica Sinica* 30 (4), S. 379–387. DOI: 10.1038/aps.2009.24.
- Emnett, Christine M.; Eisenman, Lawrence N.; Taylor, Amanda M.; Izumi, Yuki-toshi; Zorumski, Charles F.; Mennerick, Steven (2013): Indistinguishable synaptic pharmacodynamics of the N-methyl-D-aspartate receptor channel blockers memantine and ketamine. In: *Molecular pharmacology* 84 (6), S. 935–947. DOI: 10.1124/mol.113.089334.

- Ernst, Russell J.; Krogager, Toke P.; Maywood, Elizabeth S.; Zanchi, Roberto; Beránek, Václav; Elliott, Thomas S.; Barry, Nicholas P.; Hastings, Michael H.; Chin, Jason W. (2016): Genetic code expansion in the mouse brain. In: *Nature chemical biology* 12 (10), S. 776–778. DOI: 10.1038/nchembio.2160.
- Fang, Min; Shen, Lan; Yin, Huan; Pan, Yu-Min; Wang, Liang; Chen, Dan; Xi, Zhi-Qin; Xiao, Zheng; Wang, Xue-Feng; Zhou, Sheng-Nian (2011): Downregulation of gephyrin in temporal lobe epilepsy neurons in humans and a rat model. In: *Synapse (New York, N.Y.)* 65 (10), S. 1006–1014. DOI: 10.1002/syn.20928.
- Feng, G.; TINTRUP, H.; KIRSCH, J.; NICHOL, M. C.; KUHSE, J.; BETZ, H.; SANES, J. R. (1998): Dual requirement for gephyrin in glycine receptor clustering and molybdoenzyme activity. In: *Science (New York, N.Y.)* 282 (5392), S. 1321–1324. DOI: 10.1126/science.282.5392.1321.
- Florance, Nicole R.; Davis, Rebecca L.; Lam, Christopher; Szperka, Christina; Zhou, Lei; Ahmad, Saba; Campen, Cynthia J.; Moss, Heather; Peter, Nadja; Gleichman, Amy J.; Glaser, Carol A.; Lynch, David R.; Rosenfeld, Myrna R.; Dalmau Josep (2009): Anti-N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) encephalitis in children and adolescents. In: *Annals of neurology* 66 (1), S. 11–18. DOI: 10.1002/ana.21756.
- Flores-Soto, M. E.; Chaparro-Huerta, V.; Escoto-Delgadillo, M.; Vazquez-Valls, E.; González-Castañeda, R. E.; Beas-Zarate, C. (2012): Structure and function of NMDA-type glutamate receptor subunits. In: *Neurología (English Edition)* 27 (5), S. 301–310. DOI: 10.1016/j.nrleng.2011.10.003.
- Fritschy, Jean-Marc; Harvey, Robert J.; Schwarz, Günter (2008): Gephyrin: where do we stand, where do we go? In: *Trends in neurosciences* 31 (5), S. 257–264. DOI: 10.1016/j.tins.2008.02.006.
- Furukawa, Hiroyasu; Singh, Satinder K.; Mancusso, Romina; Gouaux, Eric (2005): Subunit arrangement and function in NMDA receptors. In: *Nature* 438 (7065), S. 185–192. DOI: 10.1038/nature04089.
- Geis, Christian; Weishaupt, Andreas; Hallermann, Stefan; Grünewald, Benedikt; Wessig, Carsten; Wulsch, Thomas; Reif, Andreas; Byts, Nadiya; Beck, Marcus; Jablonka, Sibylle; Boettger, Michael K.; Üçeyler, Nurcan; Fouquet, Wernher; Gerlach, Manfred; Meinck, Hans-Michael; Sirén, Anna-Leena; Sigrist, Stephan J.; Toyka, Klaus V.; Heckmann, Manfred; Sommer Claudia (2010): Stiff person syndrome-associated autoantibodies to amphiphysin mediate reduced GABAergic inhibition. In: *Brain : a journal of neurology* 133 (11), S. 3166–3180. DOI: 10.1093/brain/awq253.

- Glasgow, Nathan G.; Johnson, Jon W. (2014): Whole-cell patch-clamp analysis of recombinant NMDA receptor pharmacology using brief glutamate applications. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1183, S. 23–41. DOI: 10.1007/978-1-4939-1096-0_2.
- Gleichman, Amy J.; Spruce, Lynn A.; Dalmau, Josep; Seeholzer, Steven H.; Lynch, David R. (2012): Anti-NMDA receptor encephalitis antibody binding is dependent on amino acid identity of a small region within the GluN1 amino terminal domain. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32 (32), S. 11082–11094. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0064-12.2012.
- Greenberg, A. S.; Avila, D.; Hughes, M.; Hughes, A.; McKinney, E. C.; Flajnik, M. F. (1995): A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. In: *Nature* 374 (6518), S. 168–173. DOI: 10.1038/374168a0.
- Guo, Hongqiu; Camargo, L. Miguel; Yeboah, Fred; Digan, Mary Ellen; Niu, Honglin; Pan, Yue; Reiling, Stephan; Soler-Llavina, Gilberto; Weihofen, Wilhelm A.; Wang, Hao-Ran; Shanker, Y. G.; Stams, Travis; Bill, Anke (2017): A NMDA-receptor calcium influx assay sensitive to stimulation by glutamate and glycine/D-serine. In: *Scientific reports* 7 (1), S. 11608. DOI: 10.1038/s41598-017-11947-x.
- Gustafsson, M. G. L. (2000): Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. SHORT COMMUNICATION. In: *J Microsc* 198 (2), S. 82–87. DOI: 10.1046/j.1365-2818.2000.00710.x.
- Hamers-Casterman, C.; Atarhouch, T.; Muyldermans, S.; Robinson, G.; Hamers, C.; Songa, E. B.; Bendahman, N.; Hamers, R. (1993): Naturally occurring antibodies devoid of light chains. In: *Nature* 363 (6428), S. 446–448. DOI: 10.1038/363446a0.
- Hamprecht, B. (1977): Structural, electrophysiological, biochemical, and pharmacological properties of neuroblastoma-glioma cell hybrids in cell culture. In: *International review of cytology* 49, S. 99–170.

- Haselmann, Holger; Mannara, Francesco; Werner, Christian; Planagumà, Jesús; Miguez-Cabello, Federico; Schmidl, Lars; Grünewald, Benedikt; Petit-Pedrol, Mar; Kirmse, Knut; Classen, Joseph; Demir, Fatih; Klöcker, Nikolaj; Soto, David; Doose, Sören; Dalmau, Josep; Hallermann, Stefan; Geis, Christian (2018): Human Autoantibodies against the AMPA Receptor Subunit GluA2 Induce Receptor Reorganization and Memory Dysfunction. In: *Neuron* 100 (1), 91-105.e9. DOI: 10.1016/j.neuron.2018.07.048.
- Heilemann, Mike; van de Linde, Sebastian; Mukherjee, Anindita; Sauer, Markus (2009): Super-resolution imaging with small organic fluorophores. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 48 (37), S. 6903–6908. DOI: 10.1002/anie.200902073.
- Heilemann, Mike; van de Linde, Sebastian; Schüttpelz, Mark; Kasper, Robert; Seefeldt, Britta; Mukherjee, Anindita; Tinnefeld, Philip; Sauer, Markus (2008): Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 47 (33), S. 6172–6176. DOI: 10.1002/anie.200802376.
- Heintzmann, Rainer; Cremer, Christoph G. (1999): Laterally modulated excitation microscopy. Improvement of resolution by using a diffraction grating. In: Irving J. Bigio, Herbert Schneckenburger, Jan Slavik, Katarina Svanberg und Pierre M. Viallet (Hg.). *BiOS Europe '98*. Stockholm, Sweden, Tuesday 8 September 1998: SPIE (SPIE Proceedings), S. 185–196.
- Hell, S. W.; Wichmann, J. (1994): Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission. Stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. In: *Optics letters* 19 (11), S. 780–782.
- Hell, Stefan W. (2007): Far-field optical nanoscopy. In: *Science (New York, N.Y.)* 316 (5828), S. 1153–1158. DOI: 10.1126/science.1137395.
- Hess, Samuel T.; Girirajan, Thanu P. K.; Mason, Michael D. (2006): Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. In: *Biophysical journal* 91 (11), S. 4258–4272. DOI: 10.1529/biophysj.106.091116.
- Hohsaka, Takahiro; Ashizuka, Yuki; Murakami, Hiroshi; Sisido, Masahiko (1996): Incorporation of Nonnatural Amino Acids into Streptavidin through In Vitro Frame-Shift Suppression. In: *Journal of the American Chemical Society* 118 (40), S. 9778–9779. DOI: 10.1021/ja9614225.

- Inoue, Hiroaki; Nojima, Hiroshi; Okayama, Hiroto (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. In: *Gene* 96 (1), S. 23–28. DOI: 10.1016/0378-1119(90)90336-P.
- Karakas, Erkan; Furukawa, Hiro (2014): Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel. In: *Science (New York, N.Y.)* 344 (6187), S. 992–997. DOI: 10.1126/science.1251915.
- Kawajiri, S.; Dingledine, R. (1993): Multiple structural determinants of voltage-dependent magnesium block in recombinant NMDA receptors. In: *Neuropharmacology* 32 (11), S. 1203–1211.
- Khayenko, Vladimir; Maric, Hans Michael (2019): Targeting GABAAR-Associated Proteins. New Modulators, Labels and Concepts. In: *Front. Mol. Neurosci.* 12, S. 132. DOI: 10.3389/fnmol.2019.00162.
- Kim, Chan Hyuk; Axup, Jun Y.; Schultz, Peter G. (2013): Protein conjugation with genetically encoded unnatural amino acids. In: *Current opinion in chemical biology* 17 (3), S. 412–419. DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.04.017.
- Kim, Eun Young; Schrader, Nils; Smolinsky, Birthe; Bedet, Cécile; Vannier, Christian; Schwarz, Günter; Schindelin, Hermann (2006): Deciphering the structural framework of glycine receptor anchoring by gephyrin. In: *The EMBO journal* 25 (6), S. 1385–1395. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601029.
- Klass, Klaus-D; Zompro, Oliver; Kristensen, Niels P.; Adis, Joachim (2002): Mantophasmatodea. A new insect order with extant members in the Afrotropics. In: *Science (New York, N.Y.)* 296 (5572), S. 1456–1459. DOI: 10.1126/science.1069397.
- Klein, Teresa; Proppert, Sven; Sauer, Markus (2014): Eight years of single-molecule localization microscopy. In: *Histochemistry and cell biology* 141 (6), S. 561–575. DOI: 10.1007/s00418-014-1184-3.
- Kleinlogel, Sonja; Terpitz, Ulrich; Legrum, Barbara; Gökbuget, Deniz; Boyden, Edward S.; Bamann, Christian; Wood, Phillip G.; Bamberg, Ernst (2011): A gene-fusion strategy for stoichiometric and co-localized expression of light-gated membrane proteins. In: *Nature methods* 8 (12), S. 1083–1088. DOI: 10.1038/nmeth.1766.
- Kneussel, Matthias; Brandstätter, Johann Helmut; Laube, Bodo; Stahl, Sabine; Müller, Ulrike; Betz, Heinrich (1999): Loss of Postsynaptic GABA A Receptor Clustering in Gephyrin-Deficient Mice. In: *J. Neurosci.* 19 (21), S. 9289–9297. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.19-21-09289.1999.

- König, Andres I.; Sorkin, Raya; Alon, Ariel; Nachmias, Dikla; Dhara, Kalyan; Brand, Guy; Yifrach, Ofer; Roichman, Yael; Arbely, Eyal; Elia, Natalie (2019): Live cell single molecule tracking and localization microscopy of bioorthogonally labeled plasma membrane proteins.
- Kreye, Jakob; Wenke, Nina K.; Chayka, Mariya; Leubner, Jonas; Murugan, Rajagopal; Maier, Nikolaus; Jurek, Betty; Ly, Lam-Thanh; Brandl, Doreen; Rost, Benjamin R.; Stumpf, Alexander; Schulz, Paulina; Radbruch, Helena; Hauser, Anja E.; Pache, Florence; Meisel, Andreas; Harms, Lutz; Paul, Friedemann; Dirnagl, Ulrich; Garner, Craig; Schmitz, Dietmar; Wardemann, Hedda; Pruss, Harald (2016): Human cerebrospinal fluid monoclonal N-methyl-D-aspartate receptor autoantibodies are sufficient for encephalitis pathogenesis. In: *Brain : a journal of neurology*. DOI: 10.1093/brain/aww208.
- Kumar, Ashok (2015): NMDA Receptor Function During Senescence. Implication on Cognitive Performance. In: *Frontiers in neuroscience* 9, S. 473. DOI: 10.3389/fnins.2015.00473.
- Kunert, Renate; Reinhart, David (2016): Advances in recombinant antibody manufacturing. In: *Applied microbiology and biotechnology* 100 (8), S. 3451–3461. DOI: 10.1007/s00253-016-7388-9.
- Ladépêche, Laurent; Planagumà, Jesús; Thakur, Shreyasi; Suárez, Irina; Hara, Makoto; Borbely, Joseph Steven; Sandoval, Angel; Laparra-Cuervo, Lara; Dalmau, Josep; Lakadamyali, Melike (2018): NMDA Receptor Autoantibodies in Autoimmune Encephalitis Cause a Subunit-Specific Nanoscale Redistribution of NMDA Receptors. In: *Cell reports* 23 (13), S. 3759–3768. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.05.096.
- Lakowicz, Joseph R. (2006): Principles of Fluorescence Spectroscopy. Third edition. Boston, MA: Springer Science+Business Media, LLC.
- Lang, Kathrin; Chin, Jason W. (2014): Cellular incorporation of unnatural amino acids and bioorthogonal labeling of proteins. In: *Chemical reviews* 114 (9), S. 4764–4806. DOI: 10.1021/cr400355w.
- Lardi-Studler, Barbara; Smolinsky, Birthe; Petitjean, Caroline M.; Koenig, Franziska; Sidler, Corinne; Meier, Jochen C.; Fritschy, Jean-Marc; Schwarz, Guenter (2007): Vertebrate-specific sequences in the gephyrin E-domain regulate cytosolic aggregation and postsynaptic clustering. In: *Journal of cell science* 120 (Pt 8), S. 1371–1382. DOI: 10.1242/jcs.003905.

- Lee, Chia-Hsueh; Lu, Wei; Michel, Jennifer Carlisle; Goehring, April; Du, Juan; Song, Xianqiang; Gouaux, Eric (2014): NMDA receptor structures reveal subunit arrangement and pore architecture. In: *Nature* 511 (7508), S. 191–197. DOI: 10.1038/nature13548.
- Lemke, Edward A. (2014): The exploding genetic code. In: *ChemBiochem : a European journal of chemical biology* 15 (12), S. 1691–1694. DOI: 10.1002/cbic.201402362.
- Lichtman, Jeff W.; Denk, Winfried (2011): The big and the small. Challenges of imaging the brain's circuits. In: *Science (New York, N.Y.)* 334 (6056), S. 618–623. DOI: 10.1126/science.1209168.
- Lionel, Anath C.; Vaags, Andrea K.; Sato, Daisuke; Gazzellone, Matthew J.; Mitchell, Elyse B.; Chen, Hong Yang et al. (2013): Rare exonic deletions implicate the synaptic organizer Gephyrin (GPHN) in risk for autism, schizophrenia and seizures. In: *Human molecular genetics* 22 (10), S. 2055–2066. DOI: 10.1093/hmg/ddt056.
- Liu, Chang C.; Schultz, Peter G. (2010): Adding new chemistries to the genetic code. In: *Annual review of biochemistry* 79, S. 413–444. DOI: 10.1146/annurev.biochem.052308.105824.
- Low, Chian-Ming; Wee, Karen Siaw-Ling (2010): New insights into the not-so-new NR3 subunits of N-methyl-D-aspartate receptor: localization, structure, and function. In: *Molecular pharmacology* 78 (1), S. 1–11. DOI: 10.1124/mol.110.064006.
- Luo, J-H; Fu, Z-Y; Losi, G.; Kim, B. G.; Prybylowski, K.; Vissel, B.; Vicini, S. (2002): Functional expression of distinct NMDA channel subunits tagged with green fluorescent protein in hippocampal neurons in culture. In: *Neuropharmacology* 42 (3), S. 306–318.
- Manzo, Carlo; Garcia-Parajo, Maria F. (2015): A review of progress in single particle tracking. From methods to biophysical insights. In: *Reports on progress in physics. Physical Society (Great Britain)* 78 (12), S. 124601. DOI: 10.1088/0034-4885/78/12/124601.
- Maric, Hans Michael; Hausrat, Torben Johann; Neubert, Franziska; Dalby, Nils Ole; Doose, Sören; Sauer, Markus; Kneussel, Matthias; Strømgaard, Kristian (2017): Gephyrin-binding peptides visualize postsynaptic sites and modulate neurotransmission. In: *Nature chemical biology* 13 (2), S. 153–160. DOI: 10.1038/nchembio.2246.

- Maric, Hans Michael; Kasaragod, Vikram Babu; Haugaard-Kedström, Linda; Hausrat, Torben Johann; Kneussel, Matthias; Schindelin, Hermann; Strømgaard, Kristian (2015): Design and synthesis of high-affinity dimeric inhibitors targeting the interactions between gephyrin and inhibitory neurotransmitter receptors. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 54 (2), S. 490–494. DOI: 10.1002/anie.201409043.
- Maric, Hans Michael; Kasaragod, Vikram Babu; Hausrat, Torben Johann; Kneussel, Matthias; Tretter, Verena; Strømgaard, Kristian; Schindelin, Hermann (2014): Molecular basis of the alternative recruitment of GABA(A) versus glycine receptors through gephyrin. In: *Nature communications* 5, S. 5767. DOI: 10.1038/ncomms6767.
- Maric, Hans-Michael; Mukherjee, Jayanta; Tretter, Verena; Moss, Stephen J.; Schindelin, Hermann (2011): Gephyrin-mediated γ -aminobutyric acid type A and glycine receptor clustering relies on a common binding site. In: *The Journal of biological chemistry* 286 (49), S. 42105–42114. DOI: 10.1074/jbc.M111.303412.
- McIlhinney, R. A.; Le Bourdellès, B.; Molnár, E.; Tricaud, N.; Streit, P.; Whiting, P. J. (1998): Assembly intracellular targeting and cell surface expression of the human N-methyl-D-aspartate receptor subunits NR1a and NR2A in transfected cells. In: *Neuropharmacology* 37 (10-11), S. 1355–1367.
- Mikasova, Lenka; Rossi, Pierre de; Bouchet, Delphine; Georges, François; Rogemond, Véronique; Didelot, Adrien; Meissirel, Claire; Honnorat, Jérôme; Groc, Laurent (2012): Disrupted surface cross-talk between NMDA and Ephrin-B2 receptors in anti-NMDA encephalitis. In: *Brain : a journal of neurology* 135 (Pt 5), S. 1606–1621. DOI: 10.1093/brain/aws092.
- Moriguchi, Shigeki; Shioda, Norifumi; Maejima, Hiroshi; Zhao, Xilong; Marszalec, William; Yeh, Jay Z.; Fukunaga, Kohji; Narahashi, Toshio (2007): Nefiracetam potentiates N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function via protein kinase C activation and reduces magnesium block of NMDA receptor. In: *Molecular pharmacology* 71 (2), S. 580–587. DOI: 10.1124/mol.106.027607.
- Mulisch, Maria; Welsch, Ulrich; Aescht, Erna (Hg.) (2015): *Romeis Mikroskopische Technik*. 19. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.

- Neubert, Franziska; Beliu, Gerti; Terpitz, Ulrich; Werner, Christian; Geis, Christian; Sauer, Markus; Doose, Sören (2018): Bioorthogonal Click Chemistry Enables Site-specific Fluorescence Labeling of Functional NMDA Receptors for Super-Resolution Imaging. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 57 (50), S. 16364–16369. DOI: 10.1002/anie.201808951.
- Nikić, Ivana; Kang, Jun Hee; Girona, Gemma Estrada; Aramburu, Iker Valle; Lemke, Edward A. (2015): Labeling proteins on live mammalian cells using click chemistry. In: *Nature protocols* 10 (5), S. 780–791. DOI: 10.1038/nprot.2015.045.
- Nikić, Ivana; Lemke, Edward A. (2015): Genetic code expansion enabled site-specific dual-color protein labeling: superresolution microscopy and beyond. In: *Current opinion in chemical biology* 28, S. 164–173. DOI: 10.1016/j.cbpa.2015.07.021.
- Nishi, M.; Hinds, H.; Lu, H. P.; Kawata, M.; Hayashi, Y. (2001): Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21 (23), RC185.
- Nong, Yi; Huang, Yue-Qiao; Salter, Michael W. (2004): NMDA receptors are moving in. In: *Current opinion in neurobiology* 14 (3), S. 353–361. DOI: 10.1016/j.conb.2004.05.001.
- Oliveira, B. L.; Guo, Z.; Bernardes, G. J. L. (2017): Inverse electron demand Diels-Alder reactions in chemical biology. In: *Chemical Society reviews* 46 (16), S. 4895–4950. DOI: 10.1039/c7cs00184c.
- Petralia, Ronald S. (2012): Distribution of extrasynaptic NMDA receptors on neurons. In: *TheScientificWorldJournal* 2012, S. 267120. DOI: 10.1100/2012/267120.
- Planaguma, Jesus; Haselmann, Holger; Mannara, Francesco; Petit-Pedrol, Mar; Grunewald, Benedikt; Aguilar, Esther; Ropke, Luise; Martin-Garcia, Elena; Titulaer, Maarten J.; Jercog, Pablo; Graus, Francesc; Maldonado, Rafael; Geis, Christian; Dalmau, Josep (2016): Ephrin-B2 prevents N-methyl-D-aspartate receptor antibody effects on memory and neuroplasticity. In: *Annals of neurology*. DOI: 10.1002/ana.24721.

- Planagumà, Jesús; Leypoldt, Frank; Mannara, Francesco; Gutiérrez-Cuesta, Javier; Martín-García, Elena; Aguilar, Esther; Titulaer, Maarten J.; Petit-Pedrol, Mar; Jain, Ankit; Balice-Gordon, Rita; Lakadamyali, Melike; Graus, Francesc; Maldonado, Rafael; Dalmau, Josep (2015): Human N-methyl D-aspartate receptor antibodies alter memory and behaviour in mice. In: *Brain: a journal of neurology* 138 (Pt 1), S. 94–109. DOI: 10.1093/brain/awu310.
- Ramberger, Melanie; Peschl, Patrick; Schanda, Kathrin; Irschick, Regina; Höftberger, Romana; Deisenhammer, Florian; Rostásy, Kevin; Berger, Thomas; Dalmau, Josep; Reindl Markus (2015): Comparison of diagnostic accuracy of microscopy and flow cytometry in evaluating N-methyl-D-aspartate receptor antibodies in serum using a live cell-based assay. In: *PloS one* 10 (3), e0122037. DOI: 10.1371/journal.pone.0122037.
- Rau, Ileana G.; Baumann, Susanne; Rusponi, Stefano; Donati, Fabio; Stepanow, Sebastian; Gragnaniello, Luca; Dreiser, Jan; Piamonteze, Cinthia; Nolting, Frithjof; Gangopadhyay, Shrubu; Albertini, Oliver R.; Macfarlane, Roger M.; Lutz, Christopher P.; Jones, Barbara A.; Gambardella, Pietro; Heinrich, Andreas J.; Brune, Harald (2014): Reaching the magnetic anisotropy limit of a 3d metal atom. In: *Science (New York, N.Y.)* 344 (6187), S. 988–992. DOI: 10.1126/science.1252841.
- Rayleigh (1903): On the Theory of Optical Images, with special reference to the Microscope. In: *Journal of the Royal Microscopical Society* 23 (4), S. 474–482. DOI: 10.1111/j.1365-2818.1903.tb04831.x.
- Rees, Mark I.; Harvey, Kirsten; Ward, Hamish; White, Julia H.; Evans, Luc; Duguid, Ian C.; Hsu, Cynthia C.-H.; Coleman, Sharon L.; Miller, Jan; Baer, Kristin; Waldvogel, Henry J.; Gibbon, Francis; Smart, Trevor G.; Owen, Michael J.; Harvey, Robert J.; Snell, Russell G. (2003): Isoform heterogeneity of the human gephyrin gene (GPHN), binding domains to the glycine receptor, and mutation analysis in hyperekplexia. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (27), S. 24688–24696. DOI: 10.1074/jbc.M301070200.
- Reiss, Jochen; Johnson, Jean L. (2003): Mutations in the molybdenum cofactor biosynthetic genes MOCS1, MOCS2, and GEPH. In: *Human mutation* 21 (6), S. 569–576. DOI: 10.1002/humu.10223.
- Roche, K. W.; Standley, S.; McCallum, J.; Dune Ly, C.; Ehlers, M. D.; Wenthold, R. J. (2001): Molecular determinants of NMDA receptor internalization. In: *Nature neuroscience* 4 (8), S. 794–802. DOI: 10.1038/90498.

- Rust, Michael J.; Bates, Mark; Zhuang, Xiaowei (2006): Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). In: *Nature methods* 3 (10), S. 793–795. DOI: 10.1038/nmeth929.
- Sander, Jörg; Ester, Martin; Kriegel, Hans-Peter; Xu, Xiaowei (1998). In: *Data Mining and Knowledge Discovery* 2 (2), S. 169–194. DOI: 10.1023/A:1009745219419.
- Schermelleh, Lothar; Carlton, Peter M.; Haase, Sebastian; Shao, Lin; Winoto, Lukman; Kner, Peter; Burke, Brian; Cardoso, M. C.; Agard, David A.; Gustafsson, Mats G. L.; Leonhardt, Heinrich; Sedat, John W. (2008): Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy. In: *Science (New York, N.Y.)* 320 (5881), S. 1332–1336. DOI: 10.1126/science.1156947.
- Schindelin, Johannes; Arganda-Carreras, Ignacio; Frise, Erwin; Kaynig, Verena; Longair, Mark; Pietzsch, Tobias; Preibisch, Stephan; Rueden, Curtis; Saalfeld, Stephan; Schmid, Benjamin; Tinevez, Jean-Yves; White, Daniel J.; Hartenstein, Volker; Eliceiri, Kevin; Tomancak, Pavel; Cardona, Albert (2012): Fiji. An open-source platform for biological-image analysis. In: *Nature methods* 9 (7), S. 676–682. DOI: 10.1038/nmeth.2019.
- Schmidt, Olaf (2017): Genetik und Molekularbiologie. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum (Lehrbuch).
- Selvaraj, Ramajeyam; Fox, Joseph M. (2013): trans-Cyclooctene--a stable, voracious dienophile for bioorthogonal labeling. In: *Current opinion in chemical biology* 17 (5), S. 753–760. DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.07.031.
- Shannon, C. E. (1949): Communication in the Presence of Noise. In: *Proc. IRE* 37 (1), S. 10–21. DOI: 10.1109/JRPROC.1949.232969.
- Shen, Hao; Tauzin, Lawrence J.; Baiyasi, Rashad; Wang, Wenxiao; Moringo, Nicholas; Shuang, Bo; Landes, Christy F. (2017): Single Particle Tracking. From Theory to Biophysical Applications. In: *Chemical reviews* 117 (11), S. 7331–7376. DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00815.
- Sletten, Ellen M.; Bertozzi, Carolyn R. (2009): Bioorthogonal chemistry. Fishing for selectivity in a sea of functionality. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 48 (38), S. 6974–6998. DOI: 10.1002/anie.200900942.
- Sola, M.; Kneussel, M.; Heck, I. S.; Betz, H.; Weissenhorn, W. (2001): X-ray crystal structure of the trimeric N-terminal domain of gephyrin. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (27), S. 25294–25301. DOI: 10.1074/jbc.M101923200.

- Sommer, Claudia; Weishaupt, Andreas; Brinkhoff, Jörg; Biko, Lydia; Wessig, Carsten; Gold, Ralf; Toyka, Klaus V. (2005): Paraneoplastic stiff-person syndrome. Passive transfer to rats by means of IgG antibodies to amphiphysin. In: *The Lancet* 365 (9468), S. 1406–1411. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)66376-3.
- Stokes, George G. (1852): Ueber die Veränderung der Brechbarkeit des Lichts. In: *Ann. Phys. Chem.* 163 (11), S. 480–490. DOI: 10.1002/andp.18521631109.
- Takano, Shiho; Takahashi, Yukitoshi; Kishi, Hiroyuki; Taguchi, Yoshiharu; Takashima, Shutaro; Tanaka, Kortaro; Muraguchi, Atsushi; Mori, Hisashi (2011): Detection of autoantibody against extracellular epitopes of N-methyl-D-aspartate receptor by cell-based assay. In: *Neuroscience research* 71 (3), S. 294–302. DOI: 10.1016/j.neures.2011.07.1834.
- Thompson, Russell E.; Larson, Daniel R.; Webb, Watt W. (2002): Precise Nanometer Localization Analysis for Individual Fluorescent Probes. In: *Biophysical journal* 82 (5), S. 2775–2783. DOI: 10.1016/S0006-3495(02)75618-X.
- Titulaer, Maarten J.; McCracken, Lindsey; Gabilondo, Iñigo; Armangué, Thaís; Glaser, Carol; Iizuka, Takahiro; Honig, Lawrence S.; Benseler, Susanne M.; Kawachi, Izumi; Martinez-Hernandez, Eugenia; Aguilar, Esther; Gresa-Arribas, Núria; Ryan-Florange, Nicole; Torrents, Abigüei; Saiz, Albert; Rosenfeld, Myrna R.; Balice-Gordon, Rita; Graus, Francesc; Dalmau, Josep (2013): Treatment and prognostic factors for long-term outcome in patients with anti-NMDA receptor encephalitis. An observational cohort study. In: *The Lancet Neurology* 12 (2), S. 157–165. DOI: 10.1016/S1474-4422(12)70310-1.
- Tokunaga, Makio; Imamoto, Naoko; Sakata-Sogawa, Kumiko (2008): Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells. In: *Nature methods* 5 (2), S. 159–161. DOI: 10.1038/nmeth1171.
- Tyagarajan, Shiva K.; Fritschy, Jean-Marc (2014): Gephyrin: a master regulator of neuronal function? In: *Nature reviews. Neuroscience* 15 (3), S. 141–156. DOI: 10.1038/nrn3670.
- van de Linde, Sebastian; Aufmkolk, Sarah; Franke, Christian; Holm, Thorge; Klein, Teresa; Löschberger, Anna; Proppert, Sven; Wolter, Steve; Sauer, Markus (2013): Investigating cellular structures at the nanoscale with organic fluorophores. In: *Chemistry & biology* 20 (1), S. 8–18. DOI: 10.1016/j.chembiol.2012.11.004.

- van de Linde, Sebastian; Heilemann, Mike; Sauer, Markus (2012): Live-cell super-resolution imaging with synthetic fluorophores. In: *Annual review of physical chemistry* 63, S. 519–540. DOI: 10.1146/annurev-physchem-032811-112012.
- van de Linde, Sebastian; Löschberger, Anna; Klein, Teresa; Heidebreder, Meike; Wolter, Steve; Heilemann, Mike; Sauer, Markus (2011): Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. In: *Nature protocols* 6 (7), S. 991–1009. DOI: 10.1038/nprot.2011.336.
- van de Linde, Sebastian; Sauer, Markus (2014): How to switch a fluorophore: from undesired blinking to controlled photoswitching. In: *Chemical Society reviews* 43 (4), S. 1076–1087. DOI: 10.1039/c3cs60195a.
- Vitaliani, Roberta; Mason, Warren; Ances, Beau; Zwerdling, Theodore; Jiang, Zhilong; Dalmau, Josep (2005): Paraneoplastic encephalitis, psychiatric symptoms, and hypoventilation in ovarian teratoma. In: *Annals of neurology* 58 (4), S. 594–604. DOI: 10.1002/ana.20614.
- Wang, Kaihang; Schmied, Wolfgang H.; Chin, Jason W. (2012): Reprogramming the genetic code. From triplet to quadruplet codes. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 51 (10), S. 2288–2297. DOI: 10.1002/anie.201105016.
- Wang, Lei; Schultz, Peter G. (2004): Expanding the genetic code. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 44 (1), S. 34–66. DOI: 10.1002/anie.200460627.
- Wang, Lei; Xie, Jianming; Schultz, Peter G. (2006): Expanding the genetic code. In: *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 35, S. 225–249. DOI: 10.1146/annurev.biophys.35.101105.121507.
- Wang, Qian; Sun, Tingting; Xu, Jianfeng; Shen, Zhouxin; Briggs, Steven P.; Zhou, Demin; Wang, Lei (2014): Response and adaptation of *Escherichia coli* to suppression of the amber stop codon. In: *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 15 (12), S. 1744–1749. DOI: 10.1002/cbic.201402235.
- Watkins, Jeffrey C.; Jane, David E. (2006): The glutamate story. In: *British journal of pharmacology* 147 Suppl 1, S100-8. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706444.
- Whelan, Donna R.; Bell, Toby D. M. (2015): Image artifacts in single molecule localization microscopy. Why optimization of sample preparation protocols matters. In: *Scientific reports* 5, S. 7924. DOI: 10.1038/srep07924.

- Wolbers, Floor; ter Braak, Paul; Le Gac, Severine; Luttge, Regina; Andersson, Helene; Vermes, Istvan; van den Berg, Albert (2006): Viability study of HL60 cells in contact with commonly used microchip materials. In: *Electrophoresis* 27 (24), S. 5073–5080. DOI: 10.1002/elps.200600203.
- Wolter, S.; Schüttpelz, M.; Tscherepanow, M.; van de Linde, S.; Heilemann, M.; Sauer, M. (2010): Real-time computation of subdiffraction-resolution fluorescence images. In: *Journal of microscopy* 237 (1), S. 12–22. DOI: 10.1111/j.1365-2818.2009.03287.x.
- Wolter, Steve; Löschberger, Anna; Holm, Thorge; Aufmkolk, Sarah; Dabauvalle, Marie-Christine; van de Linde, Sebastian; Sauer, Markus (2012): rapidSTORM. Accurate, fast open-source software for localization microscopy. In: *Nature methods* 9 (11), S. 1040–1041. DOI: 10.1038/nmeth.2224.
- Zhang, Wen-Bo; Ross, P. Joel; Tu, YuShan; Wang, Yongqian; Beggs, Simon; Sengar, Ameet S.; Ellis, James; Salter, Michael W. (2016): Fyn Kinase regulates GluN2B subunit-dominant NMDA receptors in human induced pluripotent stem cell-derived neurons. In: *Scientific reports* 6, S. 23837. DOI: 10.1038/srep23837.
- Zhang, Yan; Gladyshev, Vadim N. (2007): High content of proteins containing 21st and 22nd amino acids, selenocysteine and pyrrolysine, in a symbiotic deltaproteobacterium of gutless worm *Olavius algarvensis*. In: *Nucleic acids research* 35 (15), S. 4952–4963. DOI: 10.1093/nar/gkm514.
- Zhu, Shujia; Riou, Morgane; Yao, C. Andrea; Carvalho, Stéphanie; Rodriguez, Pamela C.; Bensaude, Olivier; Paoletti, Pierre; Ye, Shixin (2014): Genetically encoding a light switch in an ionotropic glutamate receptor reveals subunit-specific interfaces. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (16), S. 6081–6086. DOI: 10.1073/pnas.1318808111.

Danksagung

Ich würde gern allen danken, die mich in den letzten Jahren während meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Zu aller erst möchte ich mich bei Markus Sauer bedanken, der es mir ermöglichte die Doktorarbeit in seiner Gruppe zu schreiben und viele interessante Projekte, Kooperationen und Konferenzen während dieser Zeit kennen lernen zu dürfen. Vielen Dank, Markus, für deine stetige Unterstützung, deine Anregungen und dein Interesse für mein Thema. Ich möchte dir ebenso dafür danken, dass du mir die Welt des Powders gezeigt hast, indem du mich beim Skifahren (bzw. Snowboarden) auf viele schöne schneereiche Offroad-Expeditionen in den Alpen mitgenommen hast.

Besonders möchte ich mich bei meinem Betreuer Sören Doose bedanken, der für meine vielen Fragen jederzeit ein offenes Ohr hatte und mir immer einen guten Rat geben konnte. Danke, dass du mir bei meinen Projekten immer zur Seite standest und wir viele lehrreiche Diskussionen führen konnten. Außerdem möchte ich dir für die Hilfe bei der Auswertung verschiedenster Daten danken. Es war immer sehr schön, mit dir zusammen zu arbeiten.

Weiterhin möchte ich Christian Geis von der Hans-Berger-Klinik für Neurologie in Jena danken, der bereitwillig das Zweitgutachten dieser Arbeit übernommen hat. Wir hatten in der gesamten Zeit meiner Doktorarbeit eine tolle Kooperation mit vielen lehrreichen Austausch und Diskussionen. Die Aufenthalte in Jena habe ich immer sehr genossen und möchte mich hier ebenso besonders bei Holger Haselmann, Lars Schmidl und Claudia Sommer bedanken.

Mein Dank gilt außerdem Hans M. Maric vom Rudolf-Virchow-Zentrum für experimentelle Biomedizin der Universität Würzburg für die tolle und erfolgreiche Zusammenarbeit und die Bereitstellung immer wieder neuer optimierter Super-Binde-Peptide.

Für eine großartige Arbeitsatmosphäre möchte ich meinen Kollegen und Freunden vom Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik danken. Hierbei möchte ich ein besonderes Dankeschön an Christian Werner aussprechen, der mir viel zum Thema neuronaler Autoimmunkrankheiten beibringen konnte und für Fragen jederzeit zur Verfügung stand. Weiterhin vielen Dank für die Präparation aller Gehirnschnittproben und Neuronen.

Außerdem danke ich Gerti Beliu für eine wunderbare Zusammenarbeit im „Click-Team“. Gerti erklärte mir die „Welt der Click-Chemie“, indem er mir alle molekularen Grundlagen zeigte und mir jederzeit eine große Hilfe war. Danke für die schöne Zeit mit dir! Vielen Dank auch an Alexander Kuhleemann, der ebenso Mitglied des „Click-Teams“ ist.

Ulrich Terpitz möchte ich für die Ermöglichung und Durchführung der Patch-Clamp-Versuche danken. Ohne ihn wären diese so nicht möglich.

Vielen Dank an Petra Geßner und Lisa Behringer-Pließ für die Zellkulturarbeiten und Unterstützung in jeglichen Labor-bezogenen Fragen. Diesbezüglich gilt mein Dankeschön auch an Marcus Behringer, Albert Gessner und Oliver Reichert für die Hilfe bei diversen mechanischen, elektrischen oder Computer-bezogenen Arbeiten.

Ich möchte außerdem meinen Bürokollegen Andreas Kurz, Fabian Zwettler, Sina Wäldchen, Felix Wäldchen und Christian (RB) Franke für eure Hilfe und die lustigen Stunden danken. Wir hatten immer sehr viel Spaß zusammen!

Ein besonderes Dankeschön geht an Letschi, Andrea, Jan, Nora, Julie, Rotbart, Tracy, Sina, Felix, Andi, Fabi, Juli, Sarah, Anne und Gerti für viele schöne Stunden im Labor, beim Skifahren, Klettern, Fahrradfahren, Chillen und Grillen. Wir hatten eine unvergessliche Zeit zusammen und ich bin froh, euch kennen gelernt zu haben.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die mich während meines gesamten Studiums unterstützten und immer für mich da waren. Danke für alles!

Erklärungen nach §4 Abs. 3 Satz 3, 5, 8 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „Markierung postsynaptischer Proteine für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie“, eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Affidavit

I hereby declare that my thesis entitled: “Labeling of postsynaptic proteins for super-resolution microscopy” is the result of my own work.

I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore I verify that the thesis has not been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg,

Franziska Neubert

