

Aus dem Institut für Zellbiologie und Neurobiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Rolle des Plasticity Related Gene-1 (PRG-1)
im Gehirn der Maus**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nora-Regina Streu

aus Berlin

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. R. Nitsch
2. Prof. Dr. med Th. G. Ohm
3. Prof. Dr. G. Rune

Datum der Promotion: 25.10.2013

Inhaltsverzeichnis

A Einleitung	5
A.1 Entdeckung des „Plasticity Related Gene – 1“ (PRG-1)	5
A.1.1 Die Familie der Lipid Phosphatasen/ Phosphotransferasen	5
A.1.2 PRG-1 und die Enzyme der Phosphatidat Phosphatasen	6
A.1.3 Der Botenstoff Lysophosphatsäure (LPA)	7
A.1.4 Interaktion von PRG-1 und Lysophosphatsäure (LPA)	8
A.1.5 Die PRG-1 defiziente Maus	9
A.1.6 Vorangegangene Untersuchungen zum Phänotyp der PRG-1 defizienten Mauslinie	10
A.2 Ziel der Arbeit	10
B Material und Methoden	11
B.1 Immunhistochemische Puffer und Lösungen	11
B.2 Antikörper	12
B.2.1 Primäre Antikörper	12
B.2.2 Sekundäre Antikörper	13
B.2.3 Der PRG-1 Antikörper	14
B.2.3.1 Spezifität des PRG-1 Antikörpers	14
B.2.3.2 Färbungen mit dem PRG-1 Antikörper	15
B.3 Histologische Methoden	15
B.3.1 Perfusion von Mäusen	15
B.3.2 Herstellung von Gewebeschnitten.....	16
B.3.2.1 Kryostatschnitte.....	16
B.3.2.2 Vibratomschnitte	16
B.3.3 Immunhistochemische Färbungen.....	16
B.3.3.1 In situ Hybridisierung von Gefriergewebeschnitten	16
B.3.3.2 DAB Färbung	17
B.3.3.3 Fluoreszenzfärbung und DAPI.....	18
B.3.4 Die Thy1 positive Maus	18
B.4 Mikroskopische Auswertung	19
B.4.1 Humane Schnitte.....	20
B.5 Die PRG-1 Knockout Maus	20
B.5.1 Das mutierte PRG-1 Protein	21
C Ergebnisse	22
C.1 Zelluläre und subzelluläre Lokalisation von PRG-1 im Hippokampus	22

C.1.1	3D Rekonstruktion von elektroporierten CA1 Pyramidenzellen	23
C.1.2	Die Synapsenebene und PRG-1 im Detail	24
C.1.2.1	Lokalisation des LPA2 Rezeptors	27
C.2	Charakteristik der PRG-1 Expression während der Entwicklung	27
C.2.1	PRG-1 wird im Kortex nur in glutamatergen Neuronen exprimiert	29
C.2.2	Dynamische Singalveränderungen in Hippokampus und Amygdala	31
C.2.2.1	Humane Färbungen gegen PRG-1	32
C.2.3	Orientierende Beschreibung der PRG-1 Expression im Zwischenhirn	33
C.2.4	PRG-1 Expression in Schaltstationen der Riechbahn	33
C.2.5	Morphologische, ultrastrukturelle Analysen der PRG-1 Expression	36
C.3	Die Maturation im Gyrus Dentatus des Hippokampus	37
D	Diskussion	40
D.1	Optimierung der immunhistochemischen Analysen	40
D.2	Das postsynaptisch lokalisierte PRG-1 moduliert die exzitatorische Transmission glutamaterger Neurone	41
D.2.1	PRG-1 wird mit Beginn der glutamatergen Synaptogenese exprimiert	43
D.3	PRG-1 Ausfall beeinflusst die neuronale Ausreifung im Hippokampus	44
D.4	Dynamik der PRG-1 Expression während der ZNS-Entwicklung	45
D.4.1	Die neuronale Vernetzung im Kortex	45
D.4.2	Mangel an PRG-1 beeinflusst das olfaktorische System	47
E	Zusammenfassung	48
F	Literaturverzeichnis	50
G	Lebenslauf	53
H	Poster, Vorträge und Publikationen	54
I	Selbstständigkeitserklärung	55
J	Danksagung	56

A Einleitung

A.1 Entdeckung des „Plasticity Related Gene – 1“ (PRG-1)

Neuronale Regeneration verläuft im klinischen Alltag weiterhin unbefriedigend. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind bisher noch unvollständig entschlüsselt und verstanden. In der Arbeitsgruppe von Prof. Nitsch wurde in diesem Zusammenhang nach Genen gesucht, die in Neuronen postläsional spezifisch hoch oder herunter reguliert werden. Neben der Regeneration nach Läsion hatte die Arbeitsgruppe das axonale Auswachsen von Neuronen im entorhinalen Kortex und Hippokampus, sowie die Verbindungen zwischen diesen Regionen im Blick. 2003 fiel ein Gen durch gleich mehrere interessante Aspekte auf: Es kodiert für ein gehirnspezifisches Membranprotein, das nur in Vertebraten existiert und nach entorhinaler Kortexläsion (ECL) hochreguliert wird (Bräuer et al., 2003). Die Expression dieses neu entdeckten Gens beginnt mit dem 19. Embryonaltag (E19) in der hippocampalen Anlage, verläuft während der Entwicklung des Gehirns dynamisch und wird nach Läsion hochreguliert. Die erwähnten Eigenschaften führten zum Namen „Plasticity Related Gene-1“ (PRG-1) (Bräuer et al., 2003).

Das PRG-1 Protein selbst umfasst 766 Aminosäuren (AS), besitzt sechs Transmembrandomänen am Amino-(N)-Terminus und einen ca. 400 AS langen hydrophilen Bereich am Carboxy-(C)-Ende (Bräuer et al., 2003). Mittlerweile konnten durch Sequenzanalysen vier weitere Proteine (PRG-2 bis 5) mit Homologien zu PRG-1 identifiziert werden, wobei nur eines (PRG-2) ebenfalls über einen langen hydrophilen C-Terminus verfügt (Bräuer et al., 2008). Die PRG-Familie weist im N-Terminalen Bereich eine hohe Sequenzhomologie zu den Lipid Phosphat Phosphatasen auf und wird zur Gruppe der PAP2 (Phosphatidic Acid Phosphatase) Superfamilie zugerechnet.

A.1.1 Die Familie der Lipid Phosphatasen/ Phosphotransferasen

Wegen ihrer Homologie zu den bekannten, membranständigen Lipid Phosphat Phosphatasen (LPPs) wurden PRGs auch als LPPs (Lipid Phosphatase Related Genes) bezeichnet und wurden als Untergruppe der Familie der Lipid Phosphatasen/Phosphotransferasen klassifiziert (Bräuer et al., 2003) (Brindley et al., 2004) (Sigal et al., 2005). Das Verständnis der PRGs setzt grundlegende Kenntnisse über die LPPs voraus. Daher werde ich die PAP Klassen, die Expression und Struktur der LPPs und

ihre mögliche physiologische Funktion, sowie die LPA vermittelte Signaltransduktion erläutern.

A.1.2 PRG-1 und die Enzyme der Phosphatidat Phosphatasen

Phosphatidat Phosphatasen (PAP) spielen eine wichtige Rolle bei der Synthese von Glycerolipiden und in der Phospholipid-vermittelten Signaltransduktion. Die PAP Familie kann in zwei Gruppen unterteilt werden. Beide Gruppen katalysieren die Dephosphorylierung von Phosphatidat (PA, Diacylglycerin-3-phosphat) zu Diacylglycerol (DAG) (Smith et al., 1957).

Während Enzyme der PAP1 Klasse zytosolisch lokalisiert sind, handelt es sich bei der PAP2/LPP-Familie um Transmembranmoleküle, die eine hohe Substratspezifität zu PA besitzen und an der Lipodystrophie im Fettgewebe, sowie an der Glycerolipidsynthese beteiligt sind (Brindley et al., 2002) (Cascales et al., 1984) (Smith et al., 1967) (Jamal et al., 1991). Darüber hinaus, zeigen die PAP2 Enzyme, im Gegensatz zur PAP1 Klasse, eine breite Substratspezifität. In vitro können diese Enzyme neben PA eine Vielzahl von „bioaktiven“ Lipid Phosphaten, wie Ceramid-1-Phosphat (C1P), Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und Lysophosphatidat (LPA) dephosphorylieren (Brindley et al., 2002) (Dillon et al., 1997). Dies führte zur Hypothese, dass die PAP2 Enzyme als negative Regulatoren der Lipid Phosphate in vivo agieren. Wegen ihrer breiten Substratspezifität wurden die PAP2 Enzyme in Lipid Phosphat Phosphatasen (LPPs) umbenannt (Brindley et al., 1998).

Die LPPs besitzen sechs stark hydrophobe Sequenzbereiche, die homolog zu LPP1 sechs mutmaßliche Transmembrandomänen bilden. Die LPPs gehören zu einer Superfamilie von Phosphatasen mit einem konservierten Phosphatase Sequenz Motiv, welches aus drei Domänen besteht (Stukey et al., 1997). Mutationen innerhalb dieser konservierten AS Bereiche führen zu einem Funktionsverlust der PAP2 Aktivität in dem murinen LPP1 (Zhang et al., 2000). Durch die Entdeckung der extrazellulär liegenden N-Glykosilierungsstelle im hydrophilen Bereich von LPP-1 und der intrazellulären Lokalisation des C-terminalen Endes, konnte das aktive Zentrum der LPPs auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran lokalisiert werden (Smith et al., 1957) (Zhang et al., 2000). Demzufolge wurden die LPPs als Ektoenzyme bezeichnet. Vermutlich können sie auf extrazelluläre Lipid Phosphate und damit auch auf deren Signaltransduktion Einfluss nehmen (Zhang et al., 2000).

Ausgehend von der Ausrichtung der LPPs innerhalb der Plasmamembran wurde dieses Modell auf PRG-1 übertragen: Der hydrophile, C-terminale Anteil wurde auf der zytoplasmatischen Seite lokalisiert, während die charakteristischen, für die PAP2 Aktivität verantwortlichen Domänen, auf der extrazellulären Seite liegen.

A.1.3 Der Botenstoff Lysophosphatsäure (LPA)

Ein Substrat der Lipid Phosphat Phosphatasen (LPPs) ist ein natürlicher Bestandteil von Zellmembranen: die Lysophosphatsäure (LPA, lysophosphatic Acid, 1-Acyl-Glycerol-3-Phosphat). Dabei handelt es sich sowohl um eines der einfachsten Lipid Phosphate, als auch um ein interzelluläres Signalmolekül. Mittlerweile wurden vielfältige Prozesse, an denen LPA beteiligt ist, identifiziert (Vogt et al., 1957) (Vogt et al., 1957) (Vogt et al., 1963) (Schumacher et al., 1979) (Tokumura et al., 1981) (van Corven et al., 1989). Im Nervensystem beispielsweise spielt LPA eine Rolle bei neuronalen Umbau- und Entwicklungsprozessen, wie der neuronalen Zellproliferation und -migration, Kontraktion, Schutz vor Apoptose, Neuritenretraktion, Myelinisierungen und Neurogenese. Es wurden jedoch auch Einflüsse von LPA auf Blutzellaggregation und Wundheilung beschrieben (Vogt et al., 1963) (Schumacher et al., 1979) (van Corven et al., 1989) (Lummen et al., 1997) (Balazs et al., 2001) (Sturm et al., 2002). 1992 konnte die Existenz eines spezifischen LPA-Rezeptors gezeigt werden (van der Bend et al., 1992) (Hecht et al., 1996). Die mittlerweile fünf beschriebenen LPA-Rezeptoren werden in Wirbeltieren zeitlich und regional spezifisch exprimiert. Ein besonderer Schwerpunkt der Rezeptorexpression liegt allerdings im Nervensystem (Ishii et al., 2004) (Fukushima et al., 2001). Die LPA-Rezeptorantworten verlaufen über verschiedene Typen von intrazellulären Second Messenger Molekülen, die durch heterotrimere G-Proteine (Gi, Gq, G12/13, Gs) aktiviert werden. Dabei können die verschiedenen LPA-Rezeptoren mit unterschiedlichen G-Proteinen und ihren sich anschließenden Signalwegen interagieren (Fukushima et al., 2001) (Moolenaar et al., 1999) (Moolenaar et al., 2004) (Anliker et al., 2004) (Mills et al., 2003) (Kranenburg et al., 2001) (Bandoh et al., 1999) (Lee et al., 2006) (Ishii et al., 2000).

Reguliert wird die LPA Signaltransduktion durch die Konzentration bioaktiver, extrazellulärer LPA. Gebildet wird LPA enzymatisch durch eine Lysophospholipase D (lysoPLD) aus Lysophosphatidylcholin (LPC). Lysophospholipase D ist identisch mit dem Protein Autotaxin (ATX), einer bereits seit 1992 bekannten, ecto-Nukleotid Pyrophosphata-

se/Phosphodiesterase 2 (NPP2) (Tokumura et al., 1986) (Tokumura et al., 2002) (Stracke et al., 1992). Ähnlich der LPA Rezeptorkonzentration kommt auch ATX/NPP2 vermehrt im Gehirn vor, jedoch existiert das Enzym auch in anderen Geweben (Bachner et al., 1999).

Deutlich wurde die physiologische Bedeutung von ATX/NPP2 für die LPA Synthese durch die Generierung der ATX/NPP2 Knockout (KO) Maus. Zu Beginn der ATX Expression, um den Embryonaltag zehn, sterben homozygote KO Mäuse in Folge einer defizienten Blutgefäßbildung. Heterozygote Mäuse sind lebensfähig, weisen im Vergleich zum Wildtyp (WT) jedoch nur die Hälfte der Plasma LPA Konzentrationen auf (van Meeteren et al., 2006) (Tanaka et al., 2006). Diese Erkenntnisse führten zu der Hypothese, dass ATX/NPP2 die primäre Quelle der extrazellulären LPA Produktion sei (van Meeteren et al., 2007).

Neben dem vermutlich physiologischen ATX/NPP2 Weg, konnte inzwischen bei Entzündungen außerdem eine LPA Produktion über die Phospholipase A2 (PLA2) nachgewiesen werden (Neidlinger et al., 2006).

Folglich ergibt sich die Konzentration der extrazellulären LPA aus dem Gleichgewicht des synthetisierenden Enzyms ATX/NPP2 und der inaktivierenden Dephosphorylierung von LPA zu dem nicht mehr bioaktiven Monoacylglycerol (MAG) (Brindley et al., 2004) (van Meeteren et al., 2007). Da die LPPs die Dephosphorylierung katalysieren, folgerte man, dass LPPs durch die Reduzierung der extrazellulären LPA Konzentration als negative Regulatoren der Rezeptor gesteuerten LPA-Signaltransduktion agieren (Brindley et al., 2004) (Sigal et al., 2005).

A.1.4 Interaktion von PRG-1 und Lysophosphatsäure (LPA)

Die bisherige Forschung hat bisher zwar vielfältige Einflüsse von LPA auf verschiedene Zellvorgänge beschrieben, die molekularen Mechanismen sind jedoch bei weitem noch unverstanden. Auch über die physiologische Rolle von LPA ist wenig bekannt. Beispielsweise sind die LPP1 und die LPP-2 defizienten Mäuse lebensfähig und zeigen keinen spezifischen Phänotyp. Offensichtlich können die physiologische Funktion der einzelnen LPPs von anderen örtlich und zeitlich gleich exprimierten LPPs ersetzt werden (Sigal et al., 2005) (Zhang et al., 2000).

Aufgrund der auffälligen Homologien von PRG-1 zu den LPPs wurde die Hypothese aufgestellt, dass PRG-1 direkt oder indirekt zur Dephosphorylierung von LPA führt (Bräuer et al., 2003). Diese Annahme stützten Beobachtungen von Bräuer et al., die die Wirkung der Gabe von LPA auf neuronale Zelllinien untersuchten. Gewöhnlich erfolgt dabei eine Neuritenretraktion. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die PRG-1 überexprimierenden Zellen gegen den Zellkollaps geschützt waren, während im Überstand dieser transfizierten Zellen die fünffache Menge des LPA Abbauproduktes MAG anfiel. Mithilfe einer Punktmutation konnten Bräuer et al. die direkte PRG-1/Phospholipid-Interaktion als Grundlage der experimentellen Beobachtungen erklären (Bräuer et al., 2003). Diese Punktmutation führt zu einem Verlust der enzymatischen LPP-Aktivität. In diesem Versuch hob die Mutation von PRG-1 den Schutz der Zellen vor LPA auf (Bräuer et al., 2003) (Starz-Gaiano et al., 2001). Der genaue Mechanismus ist allerdings noch nicht geklärt. Die Gruppe der PRGs besitzt innerhalb der Phosphatasedomänen einige nicht-konservierte Änderungen der Aminosäuren. In PRG-1 sind drei AS ausgetauscht, die für eine Phosphataseaktivität essentiell sind (Zhang et al., 2000) (Stukey et al., 1997) (McDermott et al., 2004). Demnach ist PRG-1 keine klassische Lipid Phosphatase, führt jedoch, wie unten beschrieben, zu einer systemrelevanten Antagonisierung der LPA-Wirkung.

A.1.5 Die PRG-1 defiziente Maus

Um dem Mechanismus der PRG-1/LPA-Interaktion näher zu kommen und die Auswirkungen von PRG-1 im Gehirn zu analysieren, wurden in der Gruppe von Prof. Nitsch zwei PRG-1 defiziente Mauslinien generiert. An der Stelle des PRG-1 Gens wurde eine aus dem gramnegativen Bakterium *Escherichia coli* stammende Sequenz für die β -Galactosidase als Reportergen eingefügt. Diese ermöglicht die Identifikation der PRG-1 exprimierenden Zellen. An den PRG-1 defizienten Mauslinien wurden Verhaltensanalysen sowie immunhistochemische Analysen und - in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dietmar Schmitz - elektrophysiologische Analysen durchgeführt.

Sowohl heterozygote, als auch PRG-1 KO Mäuse erwiesen sich als lebensfähig, jedoch mit einer deutlich erhöhten, postnatalen Sterblichkeit der homozygoten Tiere. Diese wurde mit dem Fehlen von PRG-1 erklärt, das zu neuronaler Übererregbarkeit führt und in juveniler Epilepsie enden kann. An deren Folgen sterben 50% der homozygoten PRG-1 defizienten Mäuse innerhalb der ersten drei bis vier Lebenswochen. Die konvul-

siven Anfälle ereignen sich in etwa am Tag 21. Elektrophysiologische Messungen zeigten eine spezifische, erhöhte Erregbarkeit der glutamatergen, exzitatorischen, hippocampalen CA1 Pyramidenzellen. Grundlage dieser erhöhten glutamatergen Transmission war eine Erhöhung der glutamatergen Spontanaktivität an den präsynaptischen Terminalien. Außerdem konnten in zwei bis vier Monate alten KO-Tieren typische postkonvulsive Umbauten, wie Moosfasersprouting und astrozytäre Gliose gefunden werden. Sowohl heterozygote als auch homozygote adulte PRG-1 KO-Tiere zeigten zudem bei Kainatapplikationen eine erhöhte Anfallsbereitschaft.

Untersuchungen einzelner, in-utero elektroporierter CA1 Pyramidenzellen im Zellverband wiesen darauf hin, dass PRG-1 die glutamaterge Signaltransduktion moduliert. Zur Validierung und Deutung war jedoch eine exakte Lokalisation von endogenem PRG-1 zwingend notwendig.

A.1.6 Vorangegangene Untersuchungen zum Phänotyp der PRG-1 defizienten Mauslinie

Morphologische Analysen ergaben keine offensichtlichen Veränderungen in der Entwicklung der Neurone bzw. der Interneurone. Die Expression der wichtigsten synaptischen Marker, sowie die elektrophysiologischen intrinsischen Eigenschaften der Zellen waren unverändert (Trimbuch et al., 2009).

Die Analysen beschränkten sich auf den Hippokampus. Darin zeigten Fluoreszenzfärbungen mit einem gegen die β -Galactosidase (β -Gal) gerichteten spezifischen Antikörper, dass PRG-1 ausschließlich in erregenden, exzitatorischen, glutamatergen Neuronen exprimiert wird. Jedoch zeigte sich, dass β -Gal in den Zellkörpern akkumulierte, so dass diese Färbungen für die subzelluläre Lokalisation von PRG-1 nicht herangezogen werden konnten.

A.2 Ziel der Arbeit

Ziel meiner Promotionsarbeit war die Beschreibung und Lokalisation der PRG-1 Expression durch immunhistochemische Analysen während der peri- und postnatalen Entwicklung, sowie im adulten Gehirn der Maus. Die Ergebnisse sollen Rückschlüsse auf die mögliche Funktion von PRG-1 erlauben und helfen, die Rolle von PRG-1 im Nervensystem besser zu verstehen.

Ich untersuchte deshalb die zelluläre und subzelluläre Lokalisation der endogenen PRG-1 Expression, die ich bis auf die Synapsenebene nachweisen konnte. Ergänzend zu diesen Analysen untersuchte ich den LPA2 Rezeptor in seiner räumlichen Beziehung zu PRG-1.

Neben der physiologischen, endogenen PRG-1 Expression habe ich auch die Lokalisation von in-utero elektroporierten wildtyp und mutierten PRG-1 Proteinen in Neuronen untersucht. Die Summe dieser Untersuchungen soll helfen, den Wirkmechanismus von PRG-1 besser zu verstehen. Anschließend habe ich die murine PRG-1 Expression an humanen Geweben exemplarisch überprüft, um eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen zu beleuchten.

Neben diesen ultrastrukturellen, intrazellulären Untersuchungen in hippocampalen Neuronen, habe ich die globale PRG-1 Verteilung im Gehirn der Maus dargestellt. Darüber hinaus untersuchte ich in einer umfangreichen Arbeit die dynamische PRG-1 Expression während Entwicklung und Reifung des Nervensystems der Maus mit dem Ziel, die systemische Rolle von PRG-1 besser verstehen zu können.

B Material und Methoden

B.1 Immunhistochemische Puffer und Lösungen

Die in den folgenden Protokollen verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden, soweit nicht anderweitig aufgeführt, von folgenden Herstellern bezogen: Merck, Roth, Roche, Sigma.

Allgemeine Puffer und Lösungen:

0,1 M PB Puffer: pH 7,4: 80,2 ml 1 M K₂HPO₄, 19,8 ml 1 M KH₂PO₄

4% PFA Lösung: 4 g Paraformaldehyd in 50 ml H₂O und 1 ml 1 M NaOH bei 60°C lösen, 10 ml 10x PBS, mit ca. 1ml 1M HCl pH 7,4 einstellen, auf 100 ml mit H₂O auffüllen und durch Faltenfilter filtrieren.

Blockierungslösung: 0,1 % (v/v) Triton X-100, 5 % Normal Goat Serum (NGS)

Narkoselösung: 10 ml Ketamin, 4 ml Rompun, 36 ml 0,9% NaCl

Tyrode Lösung: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1,8 mM CaCl₂, 0,2 mM Na₂HPO₄, 12 mM NaHCO₃, 5,5 mM D-Glucose.

DAB-Färbung

ABC-Lösung: (VECTASTAIN®, Vector) 0,5 % (v/v) Reagenz A, 0,5 % (v/v) Reagenz B in 0,1 M PB Puffer mischen und 30 min bei Raumtemperatur inkubieren

DAB-Lösung: 17,5 mg DAB in 25 ml 0,1 M PB Puffer lösen, 1 min Ultraschallbad, filtrieren und kalt stellen (4 °C). Zur Verstärkung des DAB Signals wurden 100µl 1% CoCl₂x6H₂O, 80µl 1% H₈N₂NiO₈S₂x6H₂O auf 10ml DAB-Lösung pipettiert.

Eindeckelung: Enthelan

gelatinierte Objektträger: 2 g Gelatine und 0,2 g Cromalaun pro 400 ml H₂O

In situ Hybridisierung

Die Bereitstellung der Sonden erfolgte durch Herrn Dr. T. Trimbuch. Die DIG-RNA Sonden umfassen 340 und 400 Basenpaare. Die Restriktionserkennungsstellen sind im Folgenden innerhalb der Sequenz (5'->3') dargestellt und unterstrichen. Es handelt sich jeweils um zwei Primerpaare (Firma Metabion).

PRG1-DIG-E7-1-Hind3-Fw TAA AGC TTC GTG GAA GAC CCA GTG AGA AG

PRG1-DIG-E7-1-EcoRI-Rev TAG AAT TCG ATG TGC ACC AAT TGG GAA G

PRG1-DIG-E7-2-Hind3-Fw TAA AGC TTG AGG AGA CCC AGG AAA ACA TAA G

PRG1-DIG-E7-2-EcoRI-Rev TAG AAT TCC CTG TTG AGG TCG TTG AGC

B.2 Antikörper

B.2.1 Primäre Antikörper

<u>Name</u>	<u>Spezies</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Verdünnung</u>
Anti-Calbindin	Maus, monoklonal	Swant	1:5000
Anti-Calretinin	Kaninchen, polyklonal	Swant	1:5000
Anti-DCX	Ziege, polyclonal	Santa Cruz	1:1500
Anti-Gad67	Maus, monoklonal	Chemicon	1:1000
Anti-GFAP	Kaninchen, polyklonal	DAKO	1:1000
Anti-GFP	Kaninchen, polyklonal	Abcam	1:1000
Anti-GluR1	Kaninchen, polyklonal	Chemicon	1:1000
Anti-GluR2	Maus, monoklonal	Chemicon	1:1000
Anti-GluR2/3	Kaninchen, polyklonal	Chemicon	1:1000
Anti-GluR4	Kaninchen, polyklonal	Upstate	1:1000
Anti-Homer 1	Maus, monoclonal	Chemicon	1:1000
Anti-Iba1	Kaninchen, polyklonal	Wako Chemicals GmbH	1:1000
Anti-LPA2	Ratte, monoclonal Klon 10D5	von J. Aoki	1:500

Anti Map2	Maus, monoclonal	Sigma	1:1000
Anti-Munc13-1	Kaninchen, polyclonal	von F. Varoqueaux	1:3500
Anti-NeuN	Maus, monoklonal	Chemicon	1:2500
Anti NMDA	Kaninchen, polyklonal	Chemicon	1:1000
Anti-NPY	Kaninchen, polyklonal	Chemicon	1:1000
Anti-NR1	Maus, monoklonal	Synaptic Systems	1:1000
Anti-Parvalbumin	Kaninchen, polyklonal	Swant	1:5000
Anti-PRG-1 "Epi- top624"	Kaninchen, polyklonal	Eigene Herstellung (624-637,NP_808332)	1:500
Anti- ProSAP2/Shank3. Böckers)	Maus, monoclonal	von T. Böckers	1:750
Anti-Bact-β-Gal	Huhn, polyclonal	Abcam	Siehe B.4
Anti-PSD95	Maus, monoklonal	Chemicon	1:250
Anti-Syn	Maus, monoklonal	Synaptic Systems	1:1000
Anti-VGat	Maus, monoklonal	Synaptic Systems	1:1000
Anti-VGlut1	Maus, monoklonal	Synaptic Systems	1:1000

B.2.2 Sekundäre Antikörper

Name	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Anti-Maus-Alexa647	Ziege	Invitrogen	1:1000
Anti-Huhn-Alexa568	Ziege	Vector	1:1000
Anti-Kaninchen-biot.	Ziege	Vector	1:1000
Anti-Kaninchen-Alexa488	Ziege	Invitrogen	1:1000
Anti-Kaninchen-Alexa568	Ziege	Invitrogen	1:1000
Anti-Maus-biot.	Ziege	Vector	1:1000
Anti-Maus-Alexa488	Ziege	Invitrogen	1:1000
Anti-Maus-Alexa568	Ziege	Invitrogen	1:1000
Anti-Huhn-Alexa568	Ziege	Vector	1:1000
Anti-Kaninchen-biot.	Ziege	Vector	1:1000
Anti-Kaninchen-Alexa488	Ziege	Invitrogen	1:1000
Anti-Kaninchen-Alexa568	Ziege	Invitrogen	1:1000
Anti-Maus-biot.	Ziege	Vector	1:1000

Anti-Maus-Alexa488	Ziege	Invitrogen	1:1000
Anti-Maus-Alexa568	Ziege	Invitrogen	1:1000

B.2.3 Der PRG-1 Antikörper

Um PRG-1 unabhängig von der β -Gal Expression immunhistochemisch sowohl im PRG-1 defizienten Mäusen, als auch in wildtyp Mäusen detektieren und um eine subzelluläre Lokalisation durchführen zu können, wurde ein Antikörper gegen das PRG-1 Protein hergestellt. Die Synthese des Peptides (AS 624 – 637) und die Immunisierung wurde von der Firma Pineda im Kaninchen durchgeführt (www.pineda-abservice.de). Im Anschluss wurde der Antikörper mittels Säulenchromatografie affinitätsgereinigt. Ich habe diesen Antikörper an wildtyp und an PRG-1 defizienten Gehirnen auf dessen Spezifität getestet. Der Antikörper „Epitop 624“, der gegen den AS-Bereich 624-637 gerichtet ist, wurde für alle hier gezeigten und beschriebenen Färbungen verwendet. Im Folgenden wird dieser Antikörper als „PRG-1 Antikörper“ und nicht als „Epitop 624“ bezeichnet.

B.2.3.1 Spezifität des PRG-1 Antikörpers

Die Spezifität des PRG-1 Antikörpers „Epitop624“ wurde nach Generierung der PRG-1^{-/-} Mauslinie in zahlreichen Vergleichsstudien an wildtyp und an PRG-1^{-/-} Mäusen getestet. Die Spezifität des PRG-1 Antikörpers wurde sowohl auf Proteinebene im Western Blot (Supplementary Figures S1D und S4D in Trimbuch et al., 2009) als auch von mir immunzytochemisch (Abbildung 1 und Supplementary Figure S1E) demonstriert.

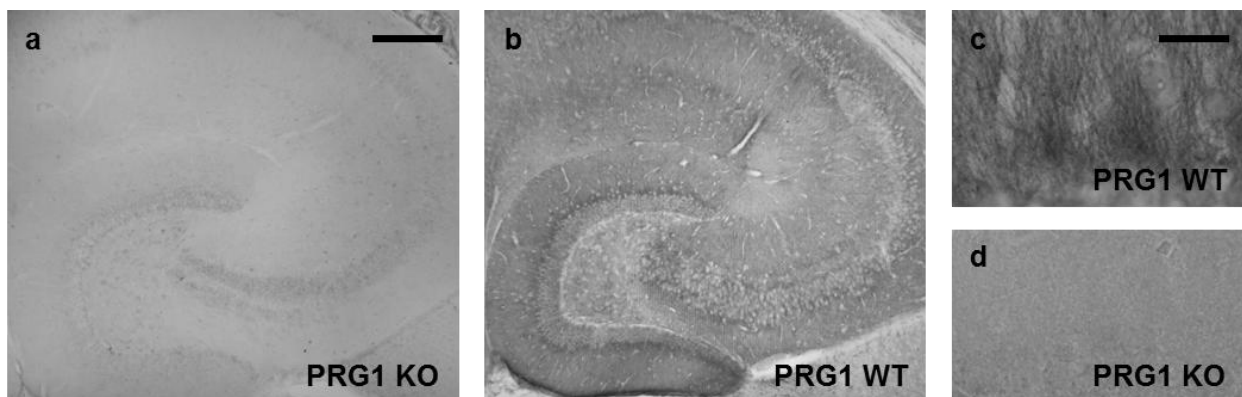


Abbildung 1: Vergleichende DAB Färbungen im adulten Hippokampus der Maus (a/b) und der CA1 Region (c/d) gegen PRG-1 im Wildtyp und Knockout Tier. Für diese Färbungen wurde der PRG-1 Antikörper „Epitop 624“ verwendet. (Skala: a, b 250nm; c, d 25nm).

Der PRG-1 „Epitop624“ Antikörper bindet am Ende des C-Terminus von PRG-1. Deswegen erkennt dieser Antikörper sowohl das wildtyp PRG-1 Protein als auch überexprimiertes PRG-1 Protein, in dem Mutationen in den funktionellen Domänen, und damit weit entfernt vom Antikörperepitop (AS 624-637), eingebaut wurden.

B.2.3.2 Färbungen mit dem PRG-1 Antikörper

In Anlehnung an das Modell der Ausrichtung der LPPs liegt der hydrophile, C-terminale Anteil von PRG-1 höchstwahrscheinlich auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran. Gewöhnlich wird das Gewebe vor immunhistochemischen Färbungen mit 0,1%igem Triton inkubiert, um die Membranen aufzubrechen und dem Antikörper die Penetration zu ermöglichen. Für den PRG-1 Antikörper modifizierte ich das Protokoll der Färbung: Die Membranen wurden in diesem Fall durch schnelles Einfrieren in flüssigem Stickstoff und eine anschließende, einstündige Inkubation mit 0,01% Triton aufgebrochen. Dafür wurden die am Vibratom geschnittenen Gehirnscheiben einzeln in ein mit einer 15%igen Succrose Lösung gefülltes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 25min entwässert. Im Anschluss wurde die Lösung abgesaugt, bis die Schnitte sich flach und glatt an den Rand des Gefäßes anlegten. Dann wurden die Gefäße in flüssigen Stickstoff gegeben, bevor sie 1h bei 4°C im Kühlschrank langsam auftauten. Nach dem vorsichtigen Überführen der Schnitte zurück in die Wells und fünf folgenden Waschschritten, blockierte ich unspezifische Bindungen mit einer Lösung aus 5% Normalem Ziegen Serum (NGS) und 0,01% Triton eine Stunde lang, bevor die Fluoreszenzfärbung nach dem beschriebenen Protokoll erfolgte.

B.3 Histologische Methoden

B.3.1 Perfusion von Mäusen

Für histologische Zwecke sind das Auswaschen des Blutes aus dem Kreislaufsystem mit einer isotonischen Lösung und die anschließende Fixierung des Gewebes vor der Färbung notwendig. Jede Maus erhielt intraperitoneal eine letale Narkoselösung entsprechend ihres Gewichtes (0,5-1ml /20-25g). Die finale Narkose war nach einigen Minuten bei völligem Fehlen von Abwehrreflexen erreicht. Nach Präparation eines freien Zugangs zum Herzen, wurde über eine Kanüle im linken Ventrikel das Tier mit 37°C warmer Tyrodelösung fünf bis acht Minuten perfundiert (1ml / 30s). Der rechte Vorhof war währenddessen eröffnet. Anschließend wurde die Maus für weitere fünf bis acht Minuten mit 4°C kalter 4% PFA Lösung perfundiert. Zum Schluss wurde das Gehirn

heraus präpariert und für 24h bei 4°C in 4% PFA Lösung nachfixiert. Am nächsten Tag wurden die Gehirne in PB Puffer überführt und die gewünschte Färbung durchgeführt.

B.3.2 Herstellung von Gewebeschnitten

B.3.2.1 Kryostatschnitte

Sollten Färbungen auf Gefrierschnitten angefertigt werden, mussten die vorbereiteten Gehirne in 30%iger Saccharose Lösung entwässert und auf Trockeneis eingefroren werden. Danach konnten die Schnitte bis zum Gebrauch bei -80°C aufbewahrt werden. Am Kryostat Leica CM1900 wurden 10µm dicke Gewebeschnitte angefertigt, auf einen Objektträger (Superfrost, R. Langenbrinck) überführt und bei -80°C gelagert werden. Für Färbungen wurden die Schnitte mit einem Fettstift umrandet. Alle Wasch- und Färbeschritte erfolgten in einer feuchten Kammer.

B.3.2.2 Vibratomschnitte

Am Vibratom HM650V von Microm wurde das Gewebe 50µm dick geschnitten und das Gewebe in PB Puffer im „free Floating“ Verfahren gefärbt.

Bei Tieren, die jünger als fünf Tage waren, wurde das Gehirn zur Stabilisierung in Agarose eingegossen, in Blockform daraus herausgeschnitten und anschließend auf dem Vibratom geschnitten. Die Agarose wurde bei der Überführung der Schnitte in 0,1M PB Puffer wieder entfernt.

B.3.3 Immunhistochemische Färbungen

B.3.3.1 In situ Hybridisierung von Gefriergewebeschnitten

Eine Digoxigenin (DIG) – in situ Hybridisierung wurde zur Darstellung transkribierter RNA im Gewebeschnitt durchgeführt. Dabei wird an komplementären RNA Molekülen gebundene, DIG markierte RNA mithilfe eines Anti-DIG FAB Fragments nachgewiesen, welches eine Färbelösung dephosphoryliert. Die Färbung entstand in Zusammenarbeit mit Dr. Trimbuch, der auch die DIG markierten RNA-Sonden herstellte. Es wurde ein 400 Basenpaare umfassendes DNA Fragment für die Erstellung des RNA Transkripts verwendet. Dieses hat Sequenzähnlichkeiten zum Exon 7 von PRG-1.

Für die eigentliche in-situ Hybridisierung fixierte man Gefrierschnitte mit 4% PFA auf dem Objektträger (OT) für 20min. Die sich dem Waschen anschließende, 10-minütige Inkubation mit Acetylierungslösung blockierte polare und geladene Proteingruppen im

Gewebe. Anschließend wurde die Lösung ausgewaschen, 5 min in PK Puffer vorinkubiert und 20min in Proteinase K (2µg/ml in PK Puffer bei RT) inkubiert. Mit Hybridisierungspuffer wurde nach erneutem Waschen in einer feuchten Kammer für 1h bei 64°C vorhybridisiert (60µl / OT). Anschließend wurden 200 ng/ml DIG markierte RNA (in Hybridisierungspuffer, denaturiert für 5 min 80 °C) auf die Schnitte pipettiert und bei 64 °C inkubiert.

Am nächsten Tag reduzierte eine Serie von Waschschritten unspezifische Bindungen der DIG-RNA auf den Schnitten: (3x 5min mit SSC Waschpuffer I; 5x10min mit Formamid I; 5x10min mit Formamid II; 3x5 min mit SSC Waschpuffer II jeweils bei 64°C; 3x5min mit SSC Waschpuffer II bei RT). Anschließend wurden die OT in TN Puffer gewaschen (3x5min) und freie Bindungsstellen mit 4% Ziegen Serum (NGS in TN-Puffer) bei 4°C über Nacht blockiert. Am nächsten Tag inkubierten die Schnitte mit Anti-DIG-Fab-AP Antikörperlösung (1:2000 in 1xTN Puffer mit 4% NGS) für 1h bei RT und wurden anschließend 3x15 min in Maleatpuffer gewaschen. Um den optimalen pH Wert der alkalischen Phosphatase im Gewebeschnitt einzustellen, wurden die OT 5min mit AP-Substratpuffer (pH 9,5) inkubiert. Anschließend wurde eine Färbelösung auf den Schnitt pipettiert und die Farbreaktion bei RT halbstündlich kontrolliert. Bei ausreichender Färbung (1-3h) wurden die OT 3x 10min in PBS und 2x 2min in H₂O gewaschen, getrocknet und in Kaisers-Gelantine (Merk) eingedeckelt.

B.3.3.2 DAB Färbung

Für Dauerpräparate wurde die 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) Färbung verwendet. Der sekundäre, Biotin-gekoppelte Antikörper bindet einen Avidin-Peroxidase Komplex (ABC Reagenz), der Wasserstoffperoxid reduzieren kann. Die freien Protonen oxidieren DAB, welches dadurch als brauner, lichtstabiler Farbstoff im Gewebe ausfällt. Zugabe von Nickelsulfat und Cobaltchlorid kann die Farbreaktion ins Violette verstärken.

Zuerst inaktiviert H₂O₂ (in PB Puffer) die endogene Peroxidase der Schnitte (30 Minuten Inkubation in 0,3% H₂O₂ (v/v)), unspezifische Antikörperbindungsstellen blockiert anschließend 5% normales Ziegenserum (NGS). Der Primärantikörper inkubiert bei 4°C, bevor am nächsten Tag der sekundäre Biotingekoppelte Antikörper (1:1000 in PB Puffer für 2 Stunden bei RT) und anschließend die ABC-Lösung für jeweils eine Stunde mit dem Schnitt inkubiert wurde. Dazwischen liegen jeweils Waschschritte. Die frisch angesetzte DAB-Lösung wurde nun mit H₂O₂ versetzt (3,3 µl 0,3 % H₂O₂ pro ml DAB

Lösung) und direkt auf die Schnitte pipettiert. Beobachtet wurde die Reaktion am Mikroskop und nach 1-3 min durch mehrmaliges Spülen in PB Puffer gestoppt. Die Gewebeschnitte wurden anschließend auf gelatinierte Objektträger (2 g Gelatine und 0,2 g Cromalaun pro 400 ml H₂O, 10min Inkubation der Objektträger aufgezogen, über Nacht getrocknet, durch eine Alkoholreihe entwässert (5min, 70 %; 5min 80 %, 2x5min 96 %, 2x5min Xylol) und in Enthelan eingedeckelt.

B.3.3.3 Fluoreszenzfärbung und DAPI

Bei dieser Färbung wird der sekundäre Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, der bei Anregung mit einer spezifischen Wellenlänge, Licht höherer Wellenlänge emittieren kann. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie.

Nach dem Auswaschen des sekundären Antikörpers werden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen, in ProLong Gold (Invitrogene) eingedeckelt und bei 4 °C aufbewahrt. Die fertige Färbung sollte zeitnah (innerhalb einiger Wochen) beurteilt werden, da die Färbung trotz abgedunkelter Lagerung ausbleichen kann.

Für die Darstellung von Zellkernen verwendete ich die 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) Färbung. Dabei handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der sich bevorzugt der DNA anlagert. DAPI strahlt bei Anregung mit ultraviolettem Licht in blauer Farbe bei einer Wellenlänge zwischen 358 und 461nm. Die geringe Anlagerung an RNA, bei der das Emissionsmaximum dann bei 500nm liegt, kann durch optische Filter eindeutig unterschieden werden. Dadurch gilt DAPI, im Gegensatz zu anderen Nucleinsäurefarbstoffen, als "DNA-spezifisch". Ein weiterer Vorteil der Färbung liegt in der Emission des kurzwelligen, blauen Lichts, wodurch gleichzeitig weitere Fluoreszenzfarbstoffe mit langwelligeren Emissionsmaxima am selben Präparat eingesetzt werden, ohne dass es zu Signalüberschneidungen kommt.

B.3.4 Die Thy1 positive Maus

Für einige Färbungen untersuchte ich CA1 Pyramidenzellen aus einer GFP-exprimierenden Thy1 Mauslinie. Bei Thy-1 handelt es sich um ein Glykoprotein, das postnatal im Thymus, dem Nervensystem und Fibroblasten exprimiert wird. (Gordon, 1987) (Morris, 1992). Pico Caroni veröffentlichte 1997 eine Expressionskassette des Thy-1.2 Gens, die anschließend genutzt wurde, um Thy1- GFP Mäuse zu erzeugen (Caroni, 1997). Dabei handelt es sich um transgene Tiere, die ein membrangebundenes, grün fluoreszierendes Protein exprimieren. Das Expressionsma-

ximum dieses GFPs liegt bei 488nm und kann somit von gängigen Argon Lasern optimal angeregt werden.

B.4 Mikroskopische Auswertung

Für die Lokalisation von PRG-1 im heterozygoten, konstitutionellen Knockout Tier, unter Verwendung der für die β -Galactosidase codierenden Reporter-kassette, ermittelte ich die ideale Konzentration der gegen die β -Galactosidase gerichteten Antikörper (β -Gal, Abcam, Cambridge, USA) in einer Verdünnungsreihe. Die optimale Antikörperkonzentration habe ich als exaktes und deutliches zelluläres Signal bei möglichst geringem Hintergrund für jede Altersstufe einzeln definiert. Schnitte von Wildtypgehirnen färbte ich als Negativkontrollen im selben Arbeitsgang mit. Ich verwendete heterozygote Tiere, da diese Tiere phänotypisch (in der Morphologie des Gehirns, der Elektrophysiologie und im Verhalten) unauffällig waren.

Als optimale Antikörperkonzentration (β -Gal) für die DAB Färbung ergab sich 1:10 000 für Embryonaltag 17 (E17), E18 und bei Neugeborenen Tieren (P0). Ab dem 5. postnatalen Tag (P5) bis zum adulten Tier verdünnte ich den Antikörper in einer Konzentration von 1:20 000. Für Immunofluoreszenzfärbungen verwendete ich, unabhängig vom Alter, den β -Gal Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000.

Die histologischen Färbungen (DAB und in-situ Hybridisierungen) in den verschiedenen Altersstufen habe ich mit einem konventionellen Mikroskop (Olympus BX51) fotografiert. Die Fluoreszenzfärbungen wurden mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (SL) von Leica mit den jeweiligen Anregungswellenlängen (488, 543, 633 nm Laser und den von der Firma Leica voreingestellten Standardbedingungen) für die gekoppelten Farbstoffe fotografiert. Die Leica Confocal Software (LCS) hatte die Version 2.6.1 buildt 1537 von 2004. Dreidimensionale Rekonstruktionen zur Darstellung der räumlichen Anordnung von synaptischen Proteinen (z. B. Lokalisationsstudien über die LPA-2 Rezeptorverteilung) wurden mit dem Programm Volocity (Perkin-Elmer, Massachusetts, USA) durchgeführt. Die Volocity 5 (x64) Software von „improvision“ mit dem Visualisierungsprogramm stand mir in der Version 5.1.0. von April 2009 zur Verfügung. Um die PRG-1 Expression im Gehirn während der Entwicklung zu beschreiben und die Hirnregionen sicher zu identifizieren wurde für die Altersstufen E17 bis P5 ein Atlas über die Entwicklungsstufen des Maushirns und ab P10 ein Atlas über das postnatale Nagergehirn verwendet (Paxinos: „The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates: Com-

pact Second Edition“, 2003 und „Atlas of the Developing Mouse Brain“, 2007). Für jedes Entwicklungsalter wertete ich mindestens vier Mäuse aus.

Um den LPA2 Rezeptor zu lokalisieren, habe ich Antikörper auf ihre Spezifität und erforderliche Konzentration für immunhistochemische Färbungen auf Hirnschnitten von LPA-rezeptordefizienten Mäusen untersucht. Der Clone 10D5 Antikörper zeigte ein klares und spezifisches Signal im Wildtyp-Hippokampus bei einer Konzentration von 1:500, während der Antikörper bei dieser Konzentration im LPA2^{-/-} Tier kein Signal aufwies. Um eine Fehlinterpretation zu vermeiden, wurde der Antikörper gegen den LPA-2 Rezeptor in einer Konzentration von 1:1000 verwendet.

B.4.1 Humane Schnitte

Bei den humanen Schnitten, die uns im Rahmen einer Kooperation mit dem Institut für Rechtsmedizin zur Verfügung gestellt wurden, untersuchte ich jeweils den Hippokampus und einen Teil des Kortex. Es handelte sich um Gehirnmateriale von einem 3,5 Monate alten Neugeborenen und einem 20jährigen, jungen Adulten. Die Färbung folgte dem Protokoll für Kryostatschnitte.

B.5 Die PRG-1 Knockout Maus

PRG-1 (AF541279) besteht aus sieben Exons und ist auf Chromosom drei lokalisiert. Die Regionen, die mutmaßlich verantwortlich für eine Interaktion mit Lipid Phosphaten sind, befinden sich auf Exon vier, fünf und sechs. Da das erste Intron besonders groß ist (24,5kb), verzichtete man auf die Deletion des Startcodons in Exon eins, um einen Start der Translation in Exon zwei, durch eventuell vorhandene Promotorregionen, zu vermeiden.

In der Arbeitsgruppe von Prof. Nitsch wurden zwei PRG-1 Knockout (KO) Mauslinien generiert. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. M. Sendtner an der Universität Würzburg und der Arbeitsgruppe von Prof. C. Birchmeier am Max-Delbrück Centrum für Molekulare Medizin (Berlin- Buch) wurden die fertigen Konstrukte für den konstitutiven und den konditionellen KO linearisiert, aufgereinigt und in embryonale Stammzellen elektroporiert. Neomycinresistente Stammzellklone wurden anschließend nach korrekter homologer Rekombination untersucht, angezogen, vermehrt und in einer PCR und/oder durch Southern Blots analysiert. Stammzellklone mit korrekter Integration des Transgens wurden für die Blastocysteninjektionen in die Uteri scheinchwangerer Weibchen

zur Generierung chimärer Mäuse ausgewählt. Bei der Verpaarung der chimären Mäuse entstanden transgene Nachkommen für die Aufzucht der Mauslinie PRG-1-KO.

Die im konstitutiven Knockout Ansatz verwendete Expressionskassette führt zum Abbruch der Translation in Exon vier. In dieser Mauslinie ist keine Zelle in der Lage PRG-1 zu exprimieren. Durch eine eingefügte Reporterkassette jedoch, kann die endogene Expression von PRG-1 mithilfe der zeitgleichen Expression der β -Galactosidase dargestellt werden. Das PRG-1 Gen kann in der zweiten Mauslinie bei Bedarf gewebespezifisch (konditionell) durch den Einsatz der Cre-Rekombinase zwischen Exon vier und sechs inaktiviert werden.

B.5.1 Das mutierte PRG-1 Protein

Eine Punktmutation im Phosphatase-Motiv der 2 extrazellulären Domäne des murinen LPP1 bewirkt einen kompletten Funktionsverlust des Proteins (Zhang et al., 2000) (Starz-Gaiano et al., 2001). Für die Mutation wird die konservierte Aminosäure Histidin durch Lysin an Position 253 getauscht (H253K). Dieses mutierte PRG-1 Protein kann durch den PRG-1 Antikörper detektiert werden, da dieser am Ende des unveränderten C-Terminus von PRG-1, am Epitop 624 bindet. Um das Protein wurde in PRG-1-KO Embryonen am Tag 15 (E15) in-utero elektroporiert.

C Ergebnisse

C.1 Zelluläre und subzelluläre Lokalisation von PRG-1 im Hippokampus

Für die folgenden morphologischen Analysen, habe ich jeweils mindestens drei Mäuse untersucht. Abbildung 2 zeigt die PRG-1 Expression im Hippokampus der adulten Maus. Der neuronale Marker NeuN erkennt spezifisch Nervenzellen. In der Vergrößerung der CA1 Region weist der Pfeil, sowohl in der einfachen als auch der PRG-1/NeuN Doppelfärbung auf den feinen, grünen PRG-1 Saum, der die Kolokalisation von PRG-1 und NeuN anzeigt. Zum Vergleich: Die scharfe Trennung der Farben bei PRG-1/Parvalbumin (PV) und die Farbmischung bei NeuN/PRG-1 als Ausdruck der nicht- bzw. vorhandenen Kolokalisation.

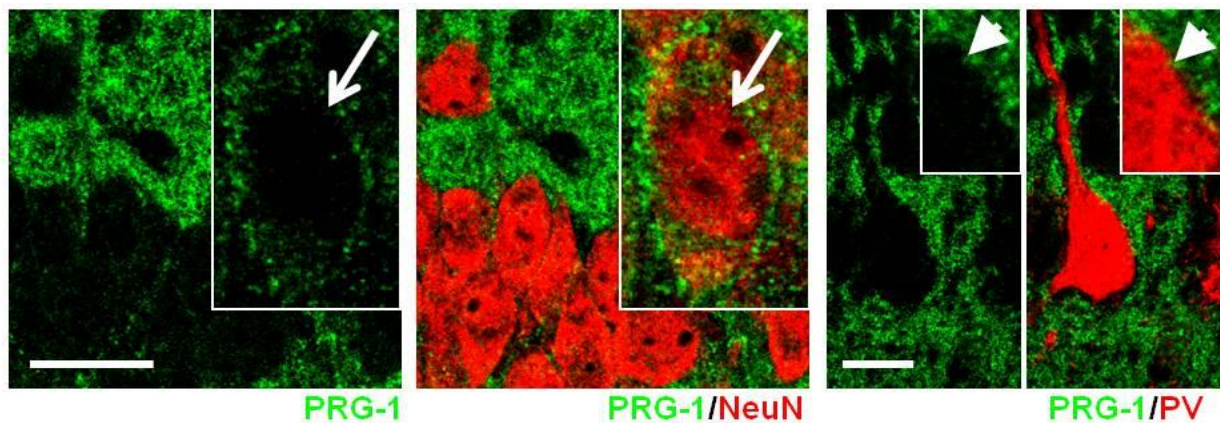


Abbildung 2: Hippokampus der Maus bei P21 CA1 Region (Skala 15µm)

In GFAP positiven Astrozyten (Abbildung 3) hingegen fehlt das PRG-1 Signal. Darüber hinaus fand ich keinen Hinweis auf eine PRG-1 Expression in GABAergen Neuronen (GAD67). Diese identifizierte und untersuchte ich in vergleichbaren Regionen des Hippokampus anhand von calciumbindenden Proteinen, wie Calbindin (CB), Calretinin (CR) und Parvalbumin (PV). CB färbt in der CA1 Region sowohl die Pyramidenzellen als auch Interneurone an. Dadurch erklärt sich die Überlappung des Signals von CB in und PRG-1 den Pyramidenzellen (Pfeil), ebenso wie die fehlende Kolokalisation in den Interneuronen (Pfeilkopf).

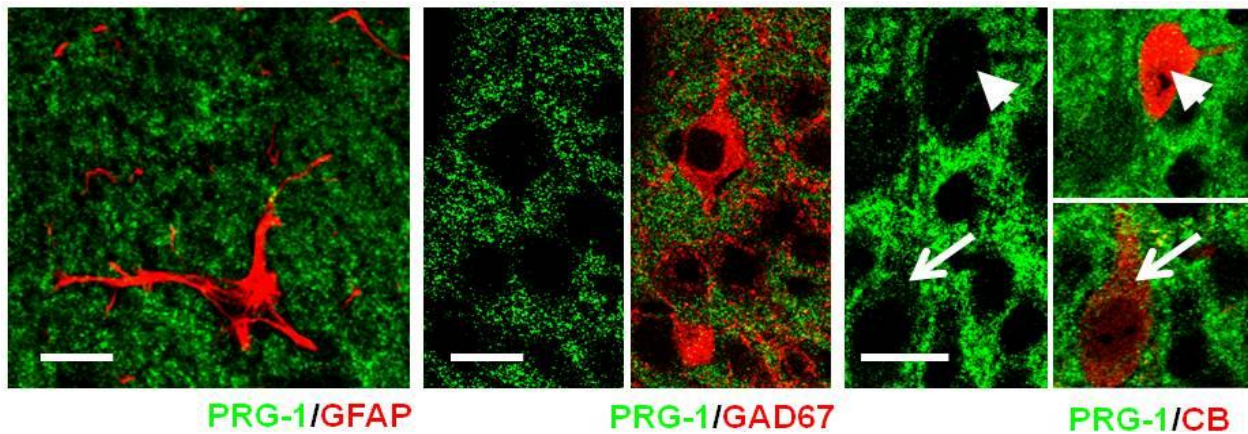


Abbildung 3: Hippokampus der Maus bei P21 PRG-1 Antikörperfärbungen (Skala 15µm)

C.1.1 3D Rekonstruktion von elektroporierten CA1 Pyramidenzellen

Um eine genaue Lokalisation von PRG-1 im Neuron zu ermöglichen, färbte ich Gehirne 21 Tage alter PRG-1-KO Tiere, die am Tag E14 elektroporiert wurden. Das verwendete Konstrukt enthielt die murine PRG-1 Sequenz und codierte darüber hinaus für eGFP, das über eine IRES-Sequenz verfügte. Das Konstrukt wurde von Herrn Thorsten Trimbuch zur Verfügung gestellt und von Herrn Jan Baumgart elektroporiert.

Nur die PRG-1/GFP ko-elektroporierten Zellen enthalten PRG-1, während die umgebenden Zellen PRG-1-negativ sind. Im Anschluss an die elektrophysiologischen Messungen färbte ich die Hirnschnitte und fertigte mittels des konfokalen Leica Mikroskops (SL) Schnittbilder, die ich mit dem Softwareprogramm Volocity 3D Image Analysis Software (Perkin-Elmer, Massachusetts, USA) als 3D-Rekonstruktionen darstellte. Mit deren Hilfe ist es möglich die Lokalisation eines Fluoreszenzsignals in Ebenen darzustellen und zu analysieren.

Abbildung 4 zeigt eine aus Schnittbildern rekonstruierte CA1 Pyramidenzelle in drei Ebenen. Die schmalen xz und yz Ebenen stehen senkrecht zum weiß gestrichelten Achsenkreuz. Der Zellkörper und der sichtbare Dendritenabschnitt sind vollständig vom roten Fluoreszenzsignal des Antikörpers gegen PRG-1 umgeben, während ich kein Signal in den Axonen fand (keine Abbildung). Die beiden schwarzen Pfeile weisen auf die membranäre Lokalisation von PRG-1 hin. Auch bei höherer Vergrößerung und dem Schnitt durch den Dendriten in der YZ Ebene im benachbarten Bild (rechts), reicht das rote PRG-1 Signal weiter als das grüne, zytoplasmatisch lokalisierte GFP Signal, was dafür spricht, dass das über *in-utero* Elektroporation rekonstruierte PRG-1 auch in der

Membran exprimiert wird. Die gestrichelten Linien sollen hier die Zuordnung der Signalgrenzen erleichtern.

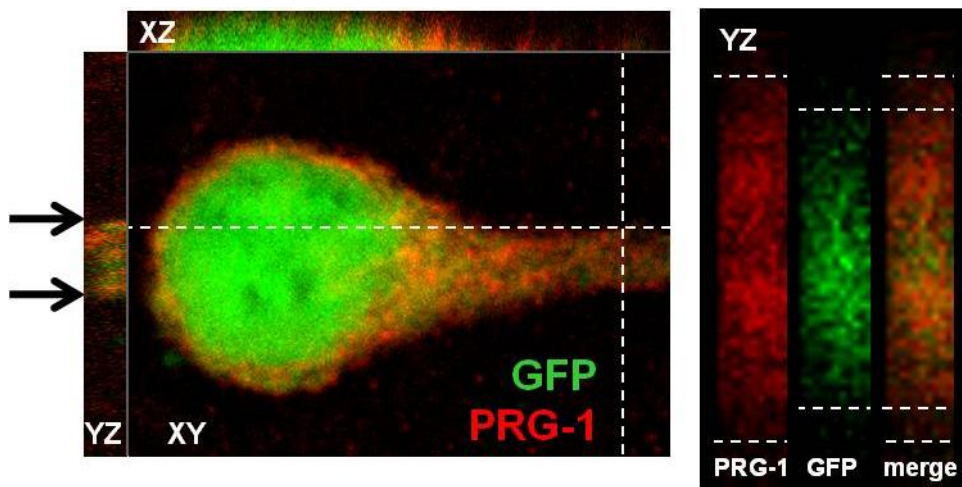


Abbildung 4: 3D Rekonstruktion einer *in utero* elektroporierten CA1 Pyramidenzelle mit PRG-1/GFP

Ich untersuchte ebenso eine mutierte PRG-1 Variante (H253K) (Abbildung 4.1). Es zeigte sich in der 3D Rekonstruktion ein dem PRG-1 Protein vergleichbares Bild: Das rote Signal der mutierten, funktionslosen PRG-1 Variante umschließt den Dendriten. Dieses Signal lässt vermuten, dass auch das mutierte PRG-1 Protein (H253K) in der Membran exprimiert wird.

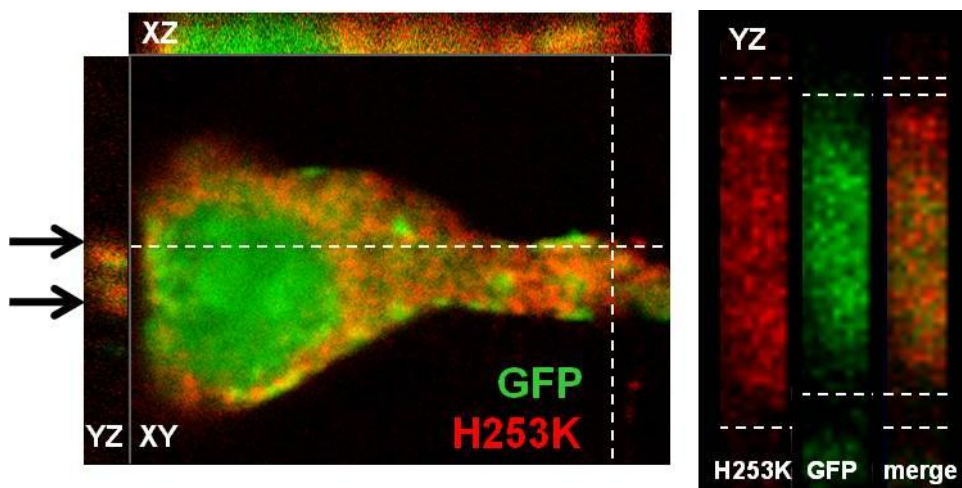


Abbildung 4.1: 3D Rekonstruktion einer *in utero* elektroporierten CA1 Pyramidenzelle mit PRG-1 (mutiert)/GFP

C.1.2 Die Synapsenebene und PRG-1 im Detail

Um durch Detailaufnahmen die PRG-1 Expression innerhalb der Synapse zu untersuchen, analysierte ich grün fluoreszierende CA1 Pyramidenzellen im Hippokampus von Thy1 Mäusen der Linie L21. Die 3D Rekonstruktionen dieser Aufnahmen sind in Abbil-

Abbildung 5 zeigt eine 3D-Rekonstruktion einer Thy1 CA1 Pyramidenzelle der Maus (P21) aus verschiedenen virtuellen Blickwinkeln und in steigender Vergrößerung zu sehen. Die Pfeile deuten auf das rote PRG-1 Antikörpersignal an der Spitze der dendritischen Dornen.

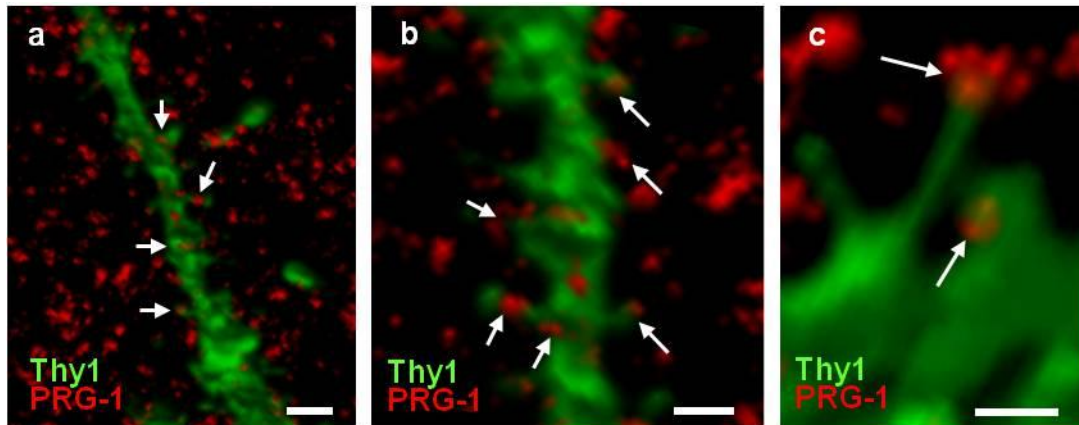
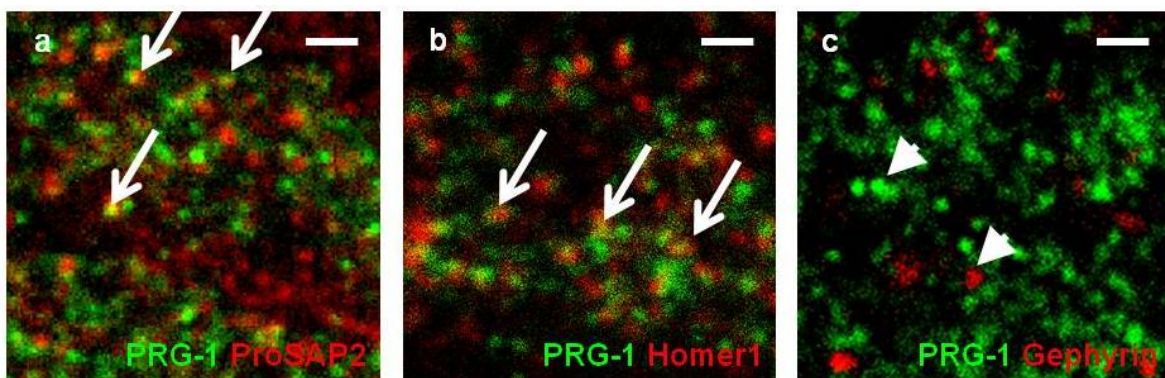


Abbildung 5: 3D Rekonstruktion einer Thy1 CA1 Pyramidenzelle der Maus (P21) (Skala: a 2µm, b+c 1µm)

Die Abbildung 6 zeigt Doppelfärbungen vergleichbarer Dendritenabschnitte aus der CA1 Region. PRG-1 kolokalisiert mit ProSAP2 und Homer 1 (Pfeile in 6a+b), während keine Kolokalisation mit Gephyrin existiert (Pfeilköpfe in 6c). VGAT, ein Marker GABAerger Synapsen in Abbildung 6d kolokalisiert ebenfalls nicht mit PRG-1. Dagegen zeigte sich eine Signalüberlappung mit dem Marker glutamaterger Synapsen VGlut1 (6e Pfeile). Auch der Marker der postsynaptischen Dichte (PSD95) kolokalisiert mit PRG-1 (6f Pfeile). Die Triplefärbung in Abbildung 6g fasst die Ergebnisse glutamaterger und GABAerger postsynaptischer Regionen mit dem PRG-1 Signal zusammen. Eine Kolokalisation von PRG-1 und Homer1 (glutamaterge Synapsen) ist ebenso deutlich zu erkennen (Pfeile), wie die fehlende Signalübereinstimmung von PRG-1 und Gephyrin (GABAerg).



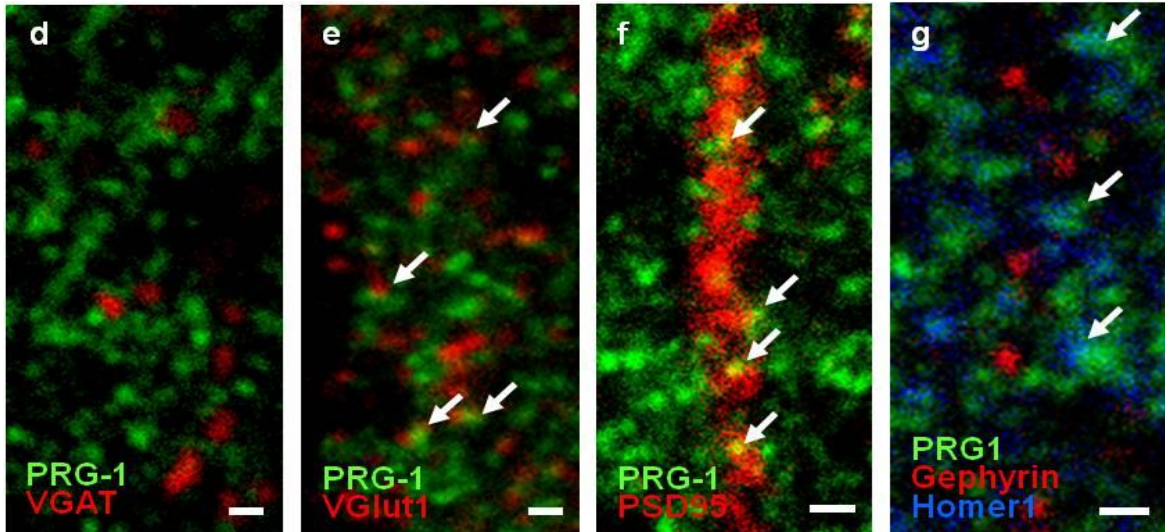


Abbildung 6: CA1 Dendriten einer 21 Tage alten Maus (Skala: 2µm)

Im Anschluss an die Ergebnisse in der Maus erstellte ich exemplarisch Färbungen eines humanen Hippokampus (Abbildung 7). Die Ausschnitte zeigen Dendriten der CA1 Region. In den Abbildungen kolokalisieren VGlut1 und PSD95 mit PRG-1 (Pfeile 7b,c), VGAT und Gephyrin hingegen nicht.

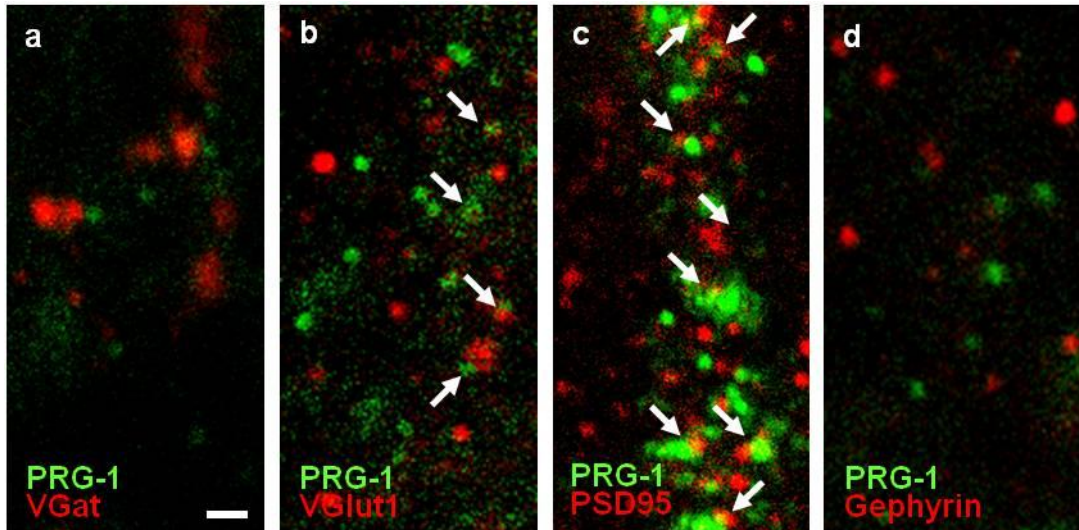


Abbildung 7: Adulte, humane CA1 Dendriten (Skala: 2µm)

C.1.2.1 Lokalisation des LPA2 Rezeptors

Um den LPA2 Rezeptor zu lokalisieren, färbte ich dreifach. In Abbildung 8 ist Munc13-1, der Marker der präsynaptischen aktiven Zone, rot (sekundärer Antikörper AI 568), der c-terminale Teil des LPA2 Rezeptors grün (sekundärer Antikörper AL488) und der Marker für glutamaterge präsynaptische Endigungen, VGLUT1, in blau dargestellt (sekundärer Antikörper AL 647). Diese Immunfluoreszenz habe ich konfokal in Schnittbildern aufgenommen. Diese Schnittbilder rekonstruierte ich anschließend zu einem dreidimensionalen Bild unter Verwendung des Programms Volocity und fand eine Dreifach-Kolokalisation der drei Marker. Durch diese 3D Rekonstruktion sind Betrachtungen aus verschiedenen virtuellen Blickwinkeln auf die dreidimensional rekonstruierte Struktur möglich. Damit stellte ich sicher, dass es sich um eine echte Kolokalisation und nicht um eine zufällige Überlappung von Signalen aus unterschiedlichen Ebenen handelt.

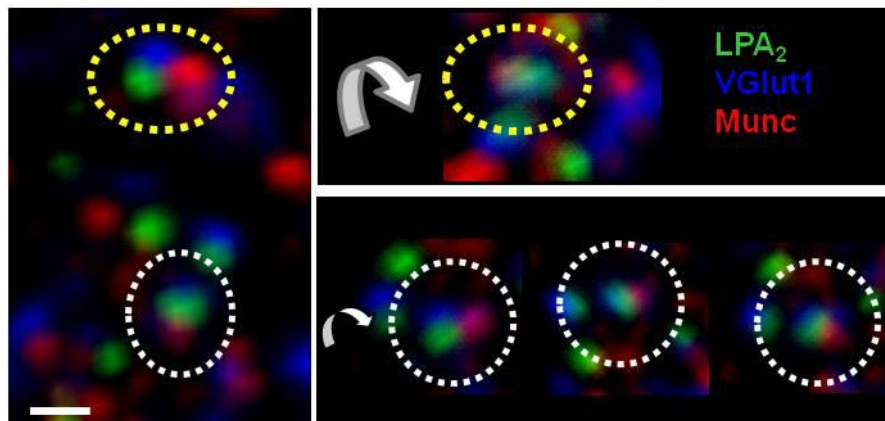


Abbildung 8: 3D Rekonstruktion eines präsynaptischen Terminals (Skala: 0,5µm)

C.2 Charakteristik der PRG-1 Expression während der Entwicklung

Um die Eignung der β Gal Färbung parallel zum PRG-1 Antikörper zu belegen, erstellte ich Vergleichsfärbungen in heterozygoten Tieren mit dem PRG-1 „Epitop624“ Antikörper, der β Gal Färbung und der Dig in-situ Hybridisierung. Abbildung 9 zeigt am Beispiel des Hippokampus eindrucksvoll die Vergleichbarkeit der Methoden. Von der Übersichtsfärbung des Hippokampus der adulten Maus (Abb. 9a) bis im Detail des Gyrus Dentatus (Abb. 9b+c) entsprechen sich die Muster der Signale. Abbildung 9c enthält zusätzlich eine Detailaufnahme der Dendriten, die das feine Signal des PRG-1 Antikörpers wiedergibt.

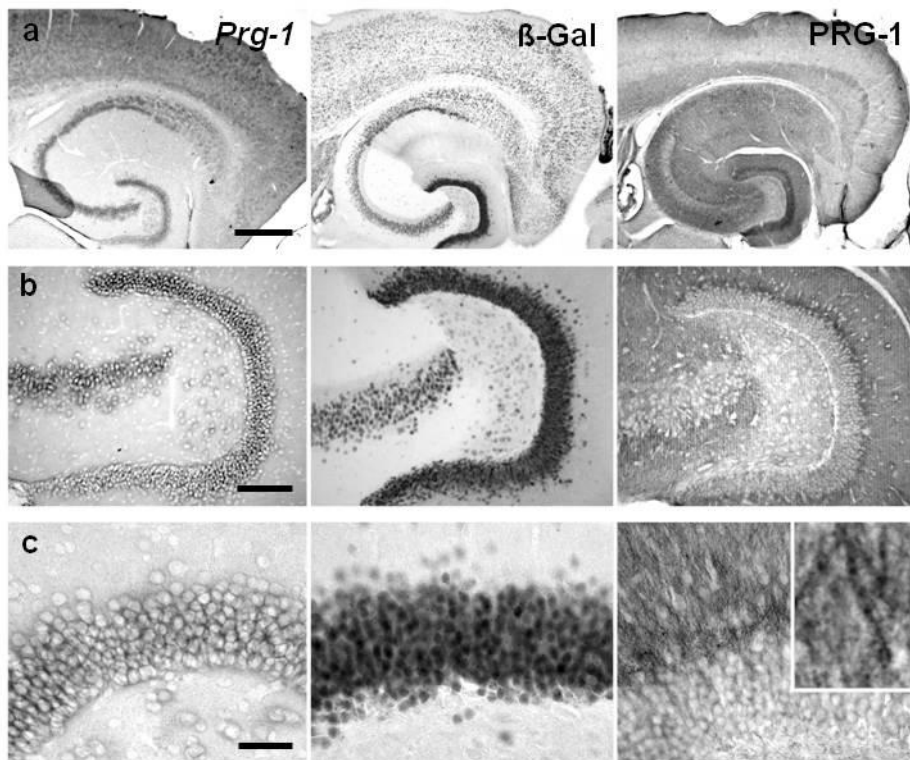


Abbildung 9: Vergleichende DAB Färbungen Hippokampus der Maus (adult) gegen PRG-1, β Gal und Dig in-situ (Skala: a 500µm; b 200nm; c 50nm)

Es wurden ausschließlich heterozygote Tiere analysiert. Die Zellen enthielten somit nur ca. halb so viel Protein wie Wildtypzellen. Anhand der Farbtiefe der β -Gal-Färbung konnte ich die Stärke der PRG-1 Expression abschätzen. Das Expressionslevel von PRG-1 verglich ich bei acht Entwicklungsstadien der Maus (E17, E18, E19, P0, P5, P10, P15, Adult) an jeweils drei bis vier Individuen.

Auffallend einfach und genau ließen sich die verschiedenen Regionen in der β Gal Färbung zuordnen und abgrenzen. Beispielsweise gelingt es spielend, die Grenze zwischen primären und sekundären somatosensorischen (Abb.10b), sowie dem primären und sekundären motorischen Kortex (Abb. 10a) eindeutig zu definieren. Ebenso ausdrucksvoll demarkiert sich die Grenze zwischen dem medialen entorhinalen Kortex und der prä- und parasubicularen Area. Die Pfeile deuten jeweils auf die scharfe Grenze zwischen zwei Schichten (Abb. 10c).

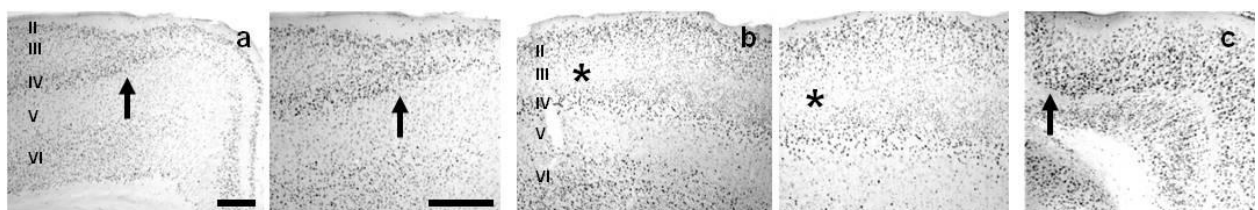


Abbildung 10: β Gal Färbung im adulten Kortex der Maus, (a=M1/M2, bS1/S2, c=enth. Cx; Skala: 250µm)

C.2.1 PRG-1 wird im Kortex nur in glutamatergen Neuronen exprimiert

Bereits am Tag der Geburt konnte ich PRG-1 in Kortexbereichen mit direktem sensorischem Input (z.B. in Abbildung 11 gezeigt am Beispiel des „Barrel Field“ des primären sensorischen Kortex (S1BF) und der primären Sehrinde (V1)) in Schicht VI detektieren. Im Laufe der folgenden fünf Tage nimmt die PRG-1 Expression im visuellen und sensorischen Kortex von unten nach oben weiter zu (Pfeile). Nach weiteren fünf Tagen exprimieren alle Schichten von II bis VI PRG-1. Danach, ab dem 15. postnatalen Tag (P15), demarkiert sich das charakteristische adulte Expressionsmuster mit dominanter Expression in den Schichten II und IV und schwacher bis keiner Expression in Schichten III und V. Diese auffällige Verteilung findet sich auch während der Entwicklung des auditorischen Kortex (keine Abbildung).

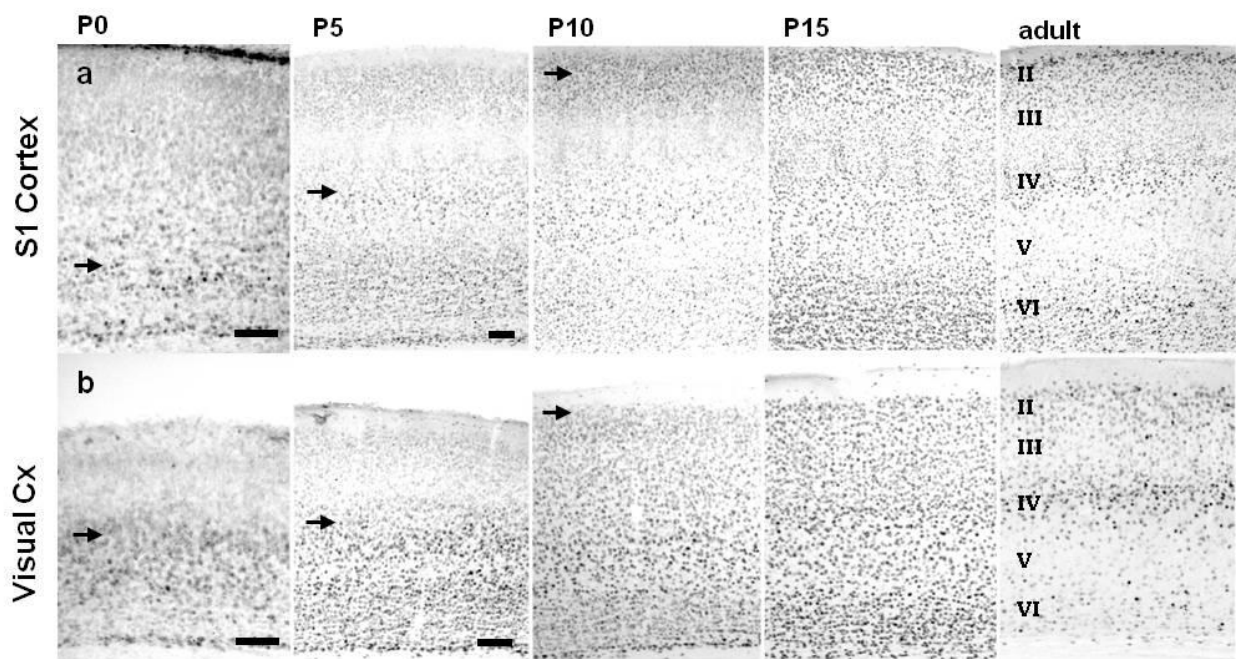


Abbildung 11: β Gal Färbung des primären sensorischen und visuellen Kortex der Maus (Skala: 250 μ m)

Anders verhält es sich während der Entwicklung im primären Motorkortex (M1, Abbildung 12). Eine starke PRG-1 Expression setzt erst fünf Tage nach der Geburt ein. Bei P0 findet sich in Schicht VI nur in wenigen Neuronen ein Signal. Die Expression in den Schichten II bis VI erfolgt ca. fünf Tage später. Im adulten Tier demarkiert sich letztendlich auch im motorischen Kortex die schichtspezifische Expression von PRG-1 in den kortikalen Schichten II und IV.

Weder Färbungen für Astrozyten (GFAP im Hippokampus), Oligodendrozyten (MAG in der Fimbria) noch für Mikroglia (IBA1 im Hippokampus) zeigten Kollokalisierungen mit β -Gal. (Abb. 13f-h) Eindrücklich fällt die β Gal-Signal-freie Fimbria ins Auge (Abb.13g) Die DNAhaltigen Zellkörper leuchten zwar blau, die Zellen exprimieren jedoch kein β Gal.

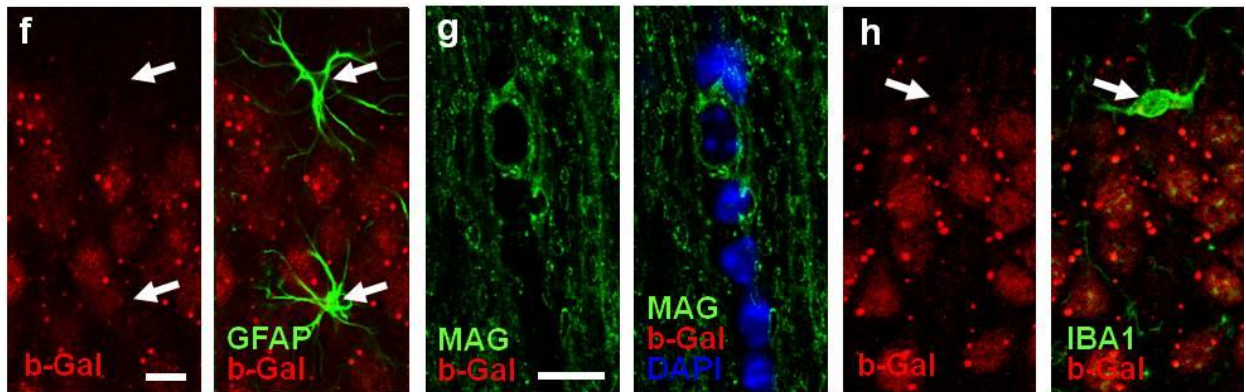


Abbildung 13b: Kollokalisierung mit β Gal im Gehirn der Maus (Skala: a-e 100 μ m, Insets 15 μ m; f-h 10 μ m)

C.2.2 Dynamische Signalveränderungen in Hippokampus und Amygdala

Im Hippokampus (Abb. 14) beginnt die PRG-1 Expression zum Zeitpunkt der Geburt (P0) in einzelnen Pyramidenzellen der äußeren CA1 Region. Fünf Tage später zieht sich ein starkes PRG-1 Signalband von CA3 bis CA1, außerdem finden sich nun auch PRG-1 positive Neurone in der äußeren Körnerzellschicht des Gyrus Dentatus (DG). Weitere zehn Tage später (P15) kristallisiert sich das charakteristische Verteilungsmuster des erwachsenen Tieres heraus: Ein markantes Signal erscheint innerhalb der Körner/ Pyramidenzellschicht des DG und in CA1. Die Signalintensität in der CA3 Region nimmt hingegen kontinuierlich ab.

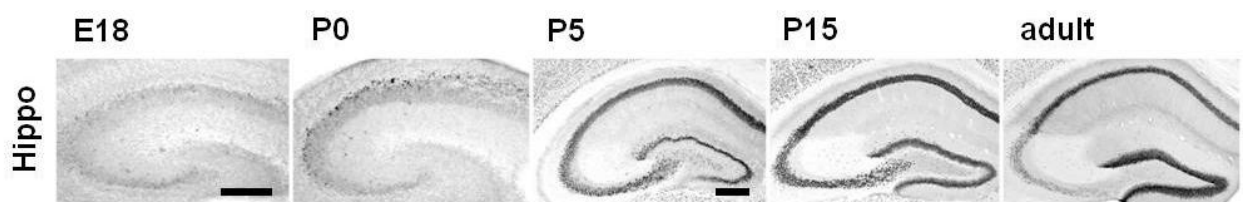


Abbildung 14: Entwicklung des Hippokampus der Maus in β Gal Färbung (Skala: 250 μ m)

Im Kernkomplex der Amygdala (keine Abbildung) zeigen sich in der Signalintensität deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Kernen. Allgemein beginnt die Expression abermals bei P0, erreicht jedoch rasch, innerhalb von fünf Tagen, ihre endgültige Ausprägung. Lediglich im anterioren Kern wird PRG-1 während der Entwicklung des Gehirns nur phasenweise exprimiert (zwischen P5 und P15). Die insgesamt stärkste PRG-1 Expression findet sich bis zum adulten Tier in den lateralen und basolateralen Kernen.

C.2.2.1 Humane Färbungen gegen PRG-1

Sowohl im Kortex als auch im Hippokampus humaner Schnitte (Abb., 15), findet sich eine Kolokalisation von PRG-1 mit NeuN (Abb, 15b, c). Wobei die Expression in Parvalbumin, Calbindin, Calretinin oder Gad67 positiven Zellen fehlt. In hoher Vergrößerung einer CA1 Pyramidenzelle bestätigte sich ebenfalls die dendritische PRG-1 Expression. (Abb,15c Vergrößerung und Abb,15d) Bei Abbildung 15d handelt es sich um die Vergrößerung eines Neurons aus dem Gyrus Dentatus.

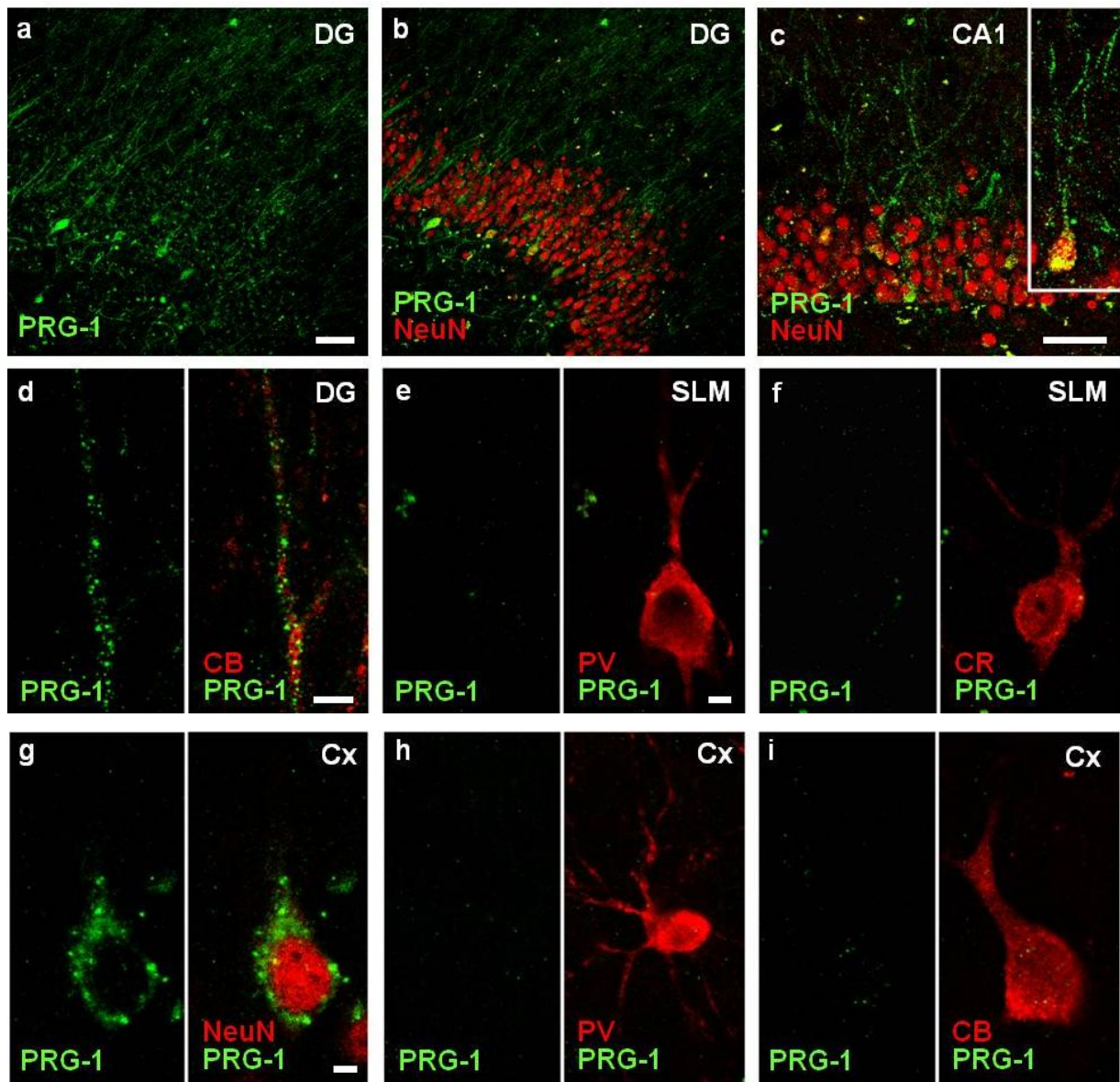


Abbildung 15: Kolokalisation mit PRG-1 im humanen Gehirn (adult: a-f; 3,5 Monate: g-i) (Skala: a+b 75µm; c 15µm; d-i 5µm)

C.2.3 Orientierende Beschreibung der PRG-1 Expression im Zwischenhirn

Im Thalamus (ohne Abbildung), fällt die Abgrenzung der einzelnen Kerne mithilfe der β Gal Färbung ungewöhnlich schwer. Die PRG-1 Expression verläuft im Thalamus so gleichmäßig, dass sich praktisch keine Grenzen zwischen den Kernen demarkieren. Somit kann ich diese beiden Regionen lediglich im Ganzen beschreiben.

Im Hypothalamus (keine Abbildung) nimmt die Expressionsstärke zum Zeitpunkt der Geburt rasant zu und zeigt einen bogenförmigen Verlauf. Im erwachsenen Tier exprimieren die Zellen des Hypothalamus kein PRG-1 mehr.

Im Thalamus findet sich ebenfalls ein kurvenförmiger Verlauf der Signalintensität, wenn auch mit weniger steilem Anstieg. Die Expression beginnt ab der Geburt, steigert sich innerhalb der nächsten fünf Tage, um im adulten Tier wieder auf ein niedrigeres Niveau zurückzugehen. Von diesem Muster weichen lediglich zwei Kerne auffällig ab: Der ventrale posteriore laterale und mediale Kern (VPL und VPM). Die Expression setzt verzögert erst fünf Tage nach der Geburt ein und verbleibt, auf einem im Vergleich zum übrigen Thalamus, niedrigen Niveau.

C.2.4 PRG-1 Expression in Schaltstationen der Riechbahn

Neben dem sensorischen Kortex untersuchte ich als Beispiel eines fast komplett im Gehirn liegenden Sinnessystems, die Riechbahn und ihre Schaltstationen. Im Main Olfactory Bulb (MOB) wird PRG-1 in Zellen der Mitral Cell Layer (MCL) bereits am Embryonaltag E18 exprimiert. Die PRG-1 Expression hält bis zum Tage der Geburt stark an (Abb., 16). Fünf Tage postnatal ändert sich dieses Bild: Das PRG-1 Signal bleibt weiterhin klar definiert in der Mitralzellschicht, zusätzlich erscheint es auch in der Körnerzellschicht (GCL).

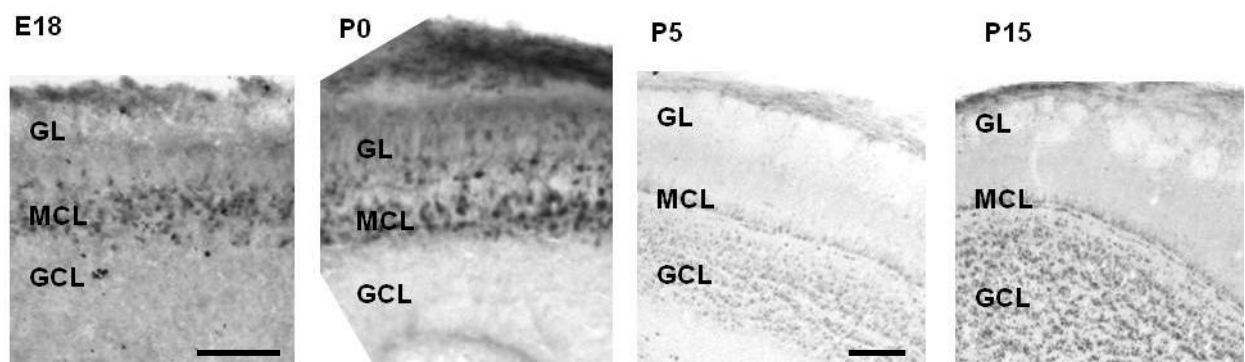


Abbildung 16: Main Olfactory Bulb (MOB) in β Gal Färbung (Skala: 150 μ m)

Vom MOB gelangt die Duftinformation über den lateralen olfaktorischen Trakt zum primären olfaktorischen Kortex, der sich aus vielen Regionen zusammensetzt. Dazu zählen u.a. der anteriore olfaktorische Kern (AON), das olfaktorische Tuberkel, der piriforme Kortex und der entorhinale Kortex. Weitere Gebiete sind der anteriore kortikale amygdaloide Kern, der periamygdaloide Kortex, die Taenia Tecta, der dorsale pedunkuläre Kortex und das dorsale hippocampale Rudiment (siehe Tabelle 1). Außerdem wird der Kern des lateralen olfaktorischen Trakts (NLOT) angesteuert. Die dortige β Gal Expression ist so scharf markiert, dass der Kern sich deutlich abhebt. Das Signal beginnt in den ersten fünf postnatalen Tagen. (Pfeile Abb., 17.1)

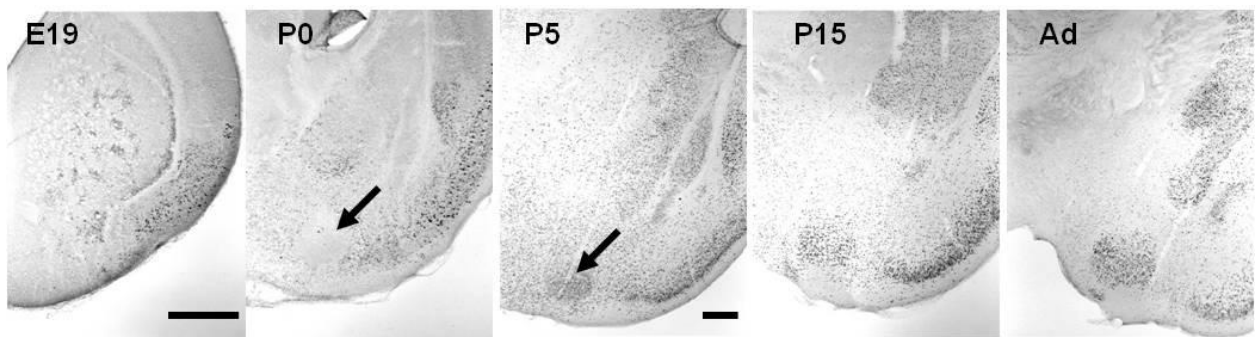


Abbildung 17.1: Kern des lateralen olfaktorischen Trakts (NLOT) in β Gal Färbung (Skala: 500 μ m)

Im piriformen Kortex (Abb., 17.2) findet sich bereits in den letzten Tagen der Embryonalentwicklung der Maus, am 18. Embryonaltag (E18), ein starkes β Gal Signal. Ab diesem Tag erscheint endogenes PRG-1 außerdem im entorhinalen Cortex. In beiden Regionen bleibt das starke PRG-1 Signal bis im adulten Stadium sichtbar.

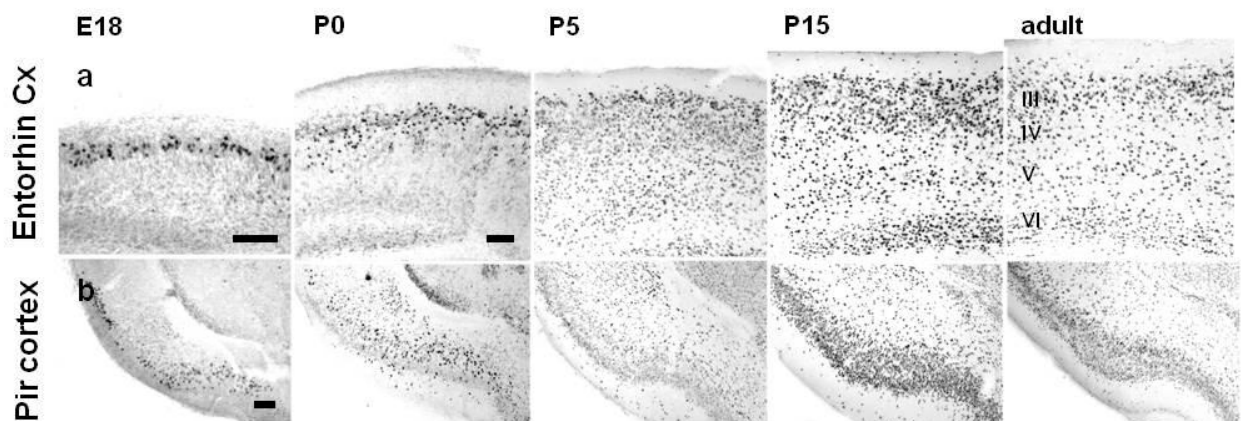


Abbildung 17.2: β Gal Färbung im piriformen und im entorhinalen Kortex (Skala: 250 μ m)

Tabelle 1: β Gal Expression in Stationen der Riechbahn während der Entwicklung

	E18	P0	P5	P15	adult
MOB; Mitral Cell Layer	++	++	++	++	++
MOB; Granular Cell Layer	-	-	+	++	++
Anteriorer olfaktorischer Nukleus	-	(+)	+	+	+
Taenia Tecta	-	++	++	++	++
Olfaktorisches Tuberkel	+	++	++	++	++
Piriformer Kortex	+	++	++	++	++
Entorhinaler Kortex	+	++	++	++	++
ant. kortikaler Amygdala. Nukleus	+	+	++	+	+
NLOT	-	-	+	++	++
Mediodorsaler Thalamus	-	+	++	++	+

C.2.5 Morphologische, ultrastrukturelle Analysen der PRG-1 Expression

Abbildung 18 zeigt die Übersicht und die Detailaufnahme einer 3D Rekonstruktion eines CA1 Neurons zum Zeitpunkt der ersten β -Gal Expression. Das CA1-Neuron wurde zur besseren Darstellung in-utero mit GFP elektroporiert. Diese Zellen untersuchte ich bei zwei und fünf Tage alten Mäusen. Bei P2 (Abb., 18a), besaßen die CA1 Nervenzellen einen apikalen Dendriten, der bis ins Stratum Radiatum (SR), jedoch noch nicht weiter hinauf reichte. In das Stratum Oriens (SO) reichten einzelne basale Dendriten. Bei P5 (Abb., 18b) entsenden die Neurone einen gut ausgebildeten apikalen Dendriten bis ins Stratum lacunosum-molekulare (SLM) und besitzen zahlreiche basale Dendriten. Die Detailaufnahmen der Dendriten zeigten charakteristische Formen sich entwickelnder Dornen in Abbildung 18d: „Beaded dendrites“, die in einem s.g. „growth cone“ enden und Filopodien tragen, „stubby synapses“ und einige wenige aufeinanderfolgende Dornen. Die weißen Pfeile markieren die wenigen, aber vorhandenen, dendritischen Dornen bei P2 (Abb., 18c).

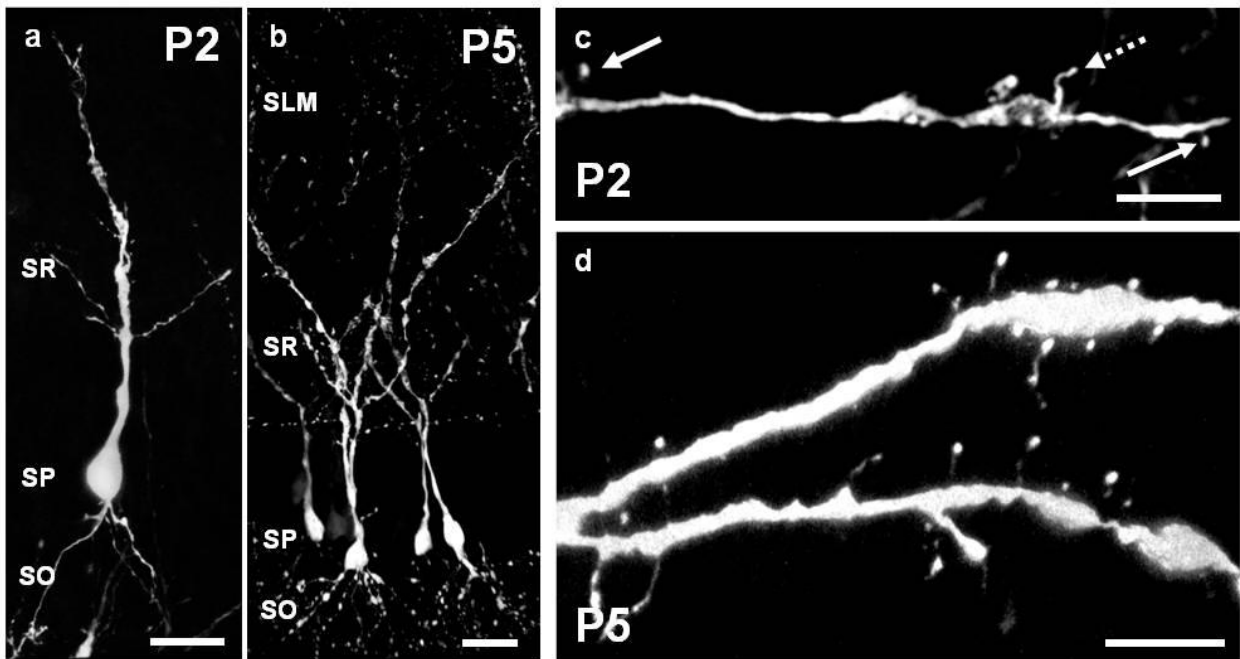


Abbildung 18: 3D Rekonstruktion von GFP-positiven Neuronen und Dendriten bei P2/P5 (Skala: a 10 μ m; b 25 μ m; c 1 μ m; d 0,5 μ m)

C.3 Die Maturation im Gyrus Dentatus des Hippokampus

Die β Gal Signalstärke nimmt im Gyrus Dentatus nicht in allen Zellen kontinuierlich zu, es ist ein Gradient erkennbar (Abb., 19). Vergleicht man P5, P10, P15 und adulte Tiere, dann beginnt die Expression in den äußeren Schichten. Erst im adulten Tier exprimieren alle Neurone PRG-1. Dieser Effekt fällt in den β Gal Färbungen ebenso auf, wie in der PRG-1 Antikörperfärbung und der *Din-situ* Hybridisierung. Zusätzlich sah ich in den Calbindin (CB) Färbungen einen vergleichbaren Gradienten. Im Gyrus Dentatus markiert CB während der Entwicklung keine Interneurone, sondern mature Körnerzellneurone. Auffällig korreliert das CB Signal mit dem PRG-1 Gradienten.

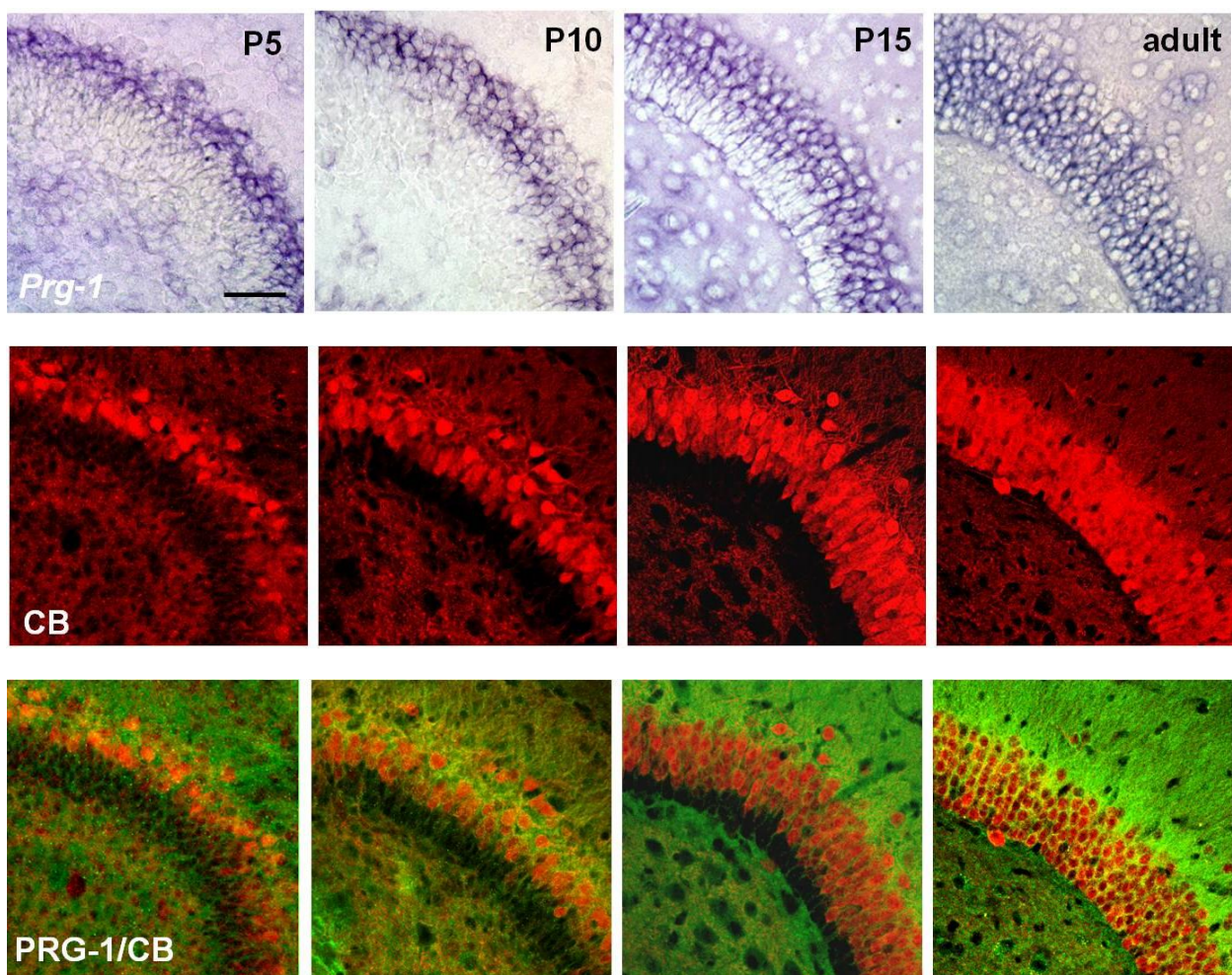


Abbildung 19: Entwicklungsreihe des Gyrus Dentatus in Dig in-situ, Calbindin (CB) und PRG-1/CB (Skala: 50 μ m)

Bei zehn Tage alten, heterozygoten Mäusen (P10) untersuchte ich dieses Phänomen genauer: Im Band des Gyrus Dentatus färbt der neuronale Marker NeuN alle Zellen an. Von diesen Neuronen exprimieren jedoch nur die äußeren auch β Gal. Abermals existie-

ren keine β Gal positiven, NeuN negativen Zellen (Abb. 20a). Calretinin ist hier ein Marker für immature und Calbindin für mature Neurone. Die Grenze der jeweiligen Färbungen demarkiert sich scharf und eindeutig. (Abb.20b) Mit Calretinin (CR), dem Marker der immaturren Neurone, existiert keine Übereinstimmung mit β Gal (Abb.20d), während alle β Gal exprimierenden Zellen vom Calbindinerkennenden Antikörper gefärbt werden (Abb. 20c). Diese Aussage lässt sich nicht nur im heterozygoten Tier, sondern ebenfalls im wildtyp Tier mit dem PRG-1 Antikörper wiederholen (Abb. 20e+f).

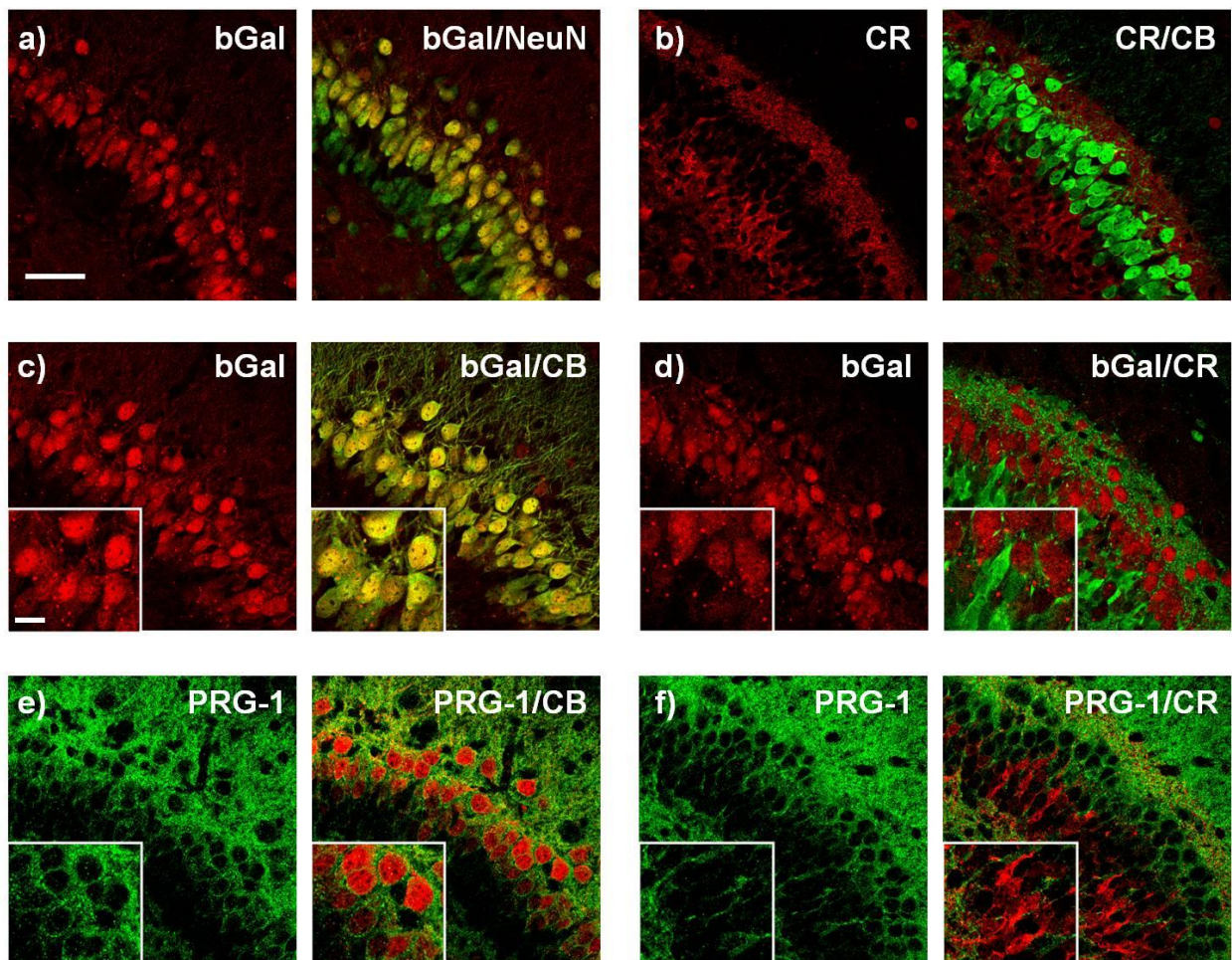
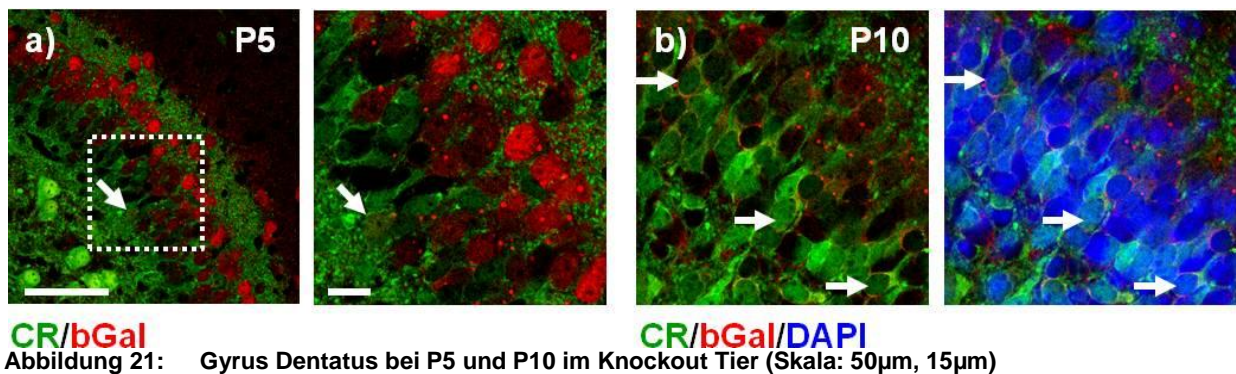


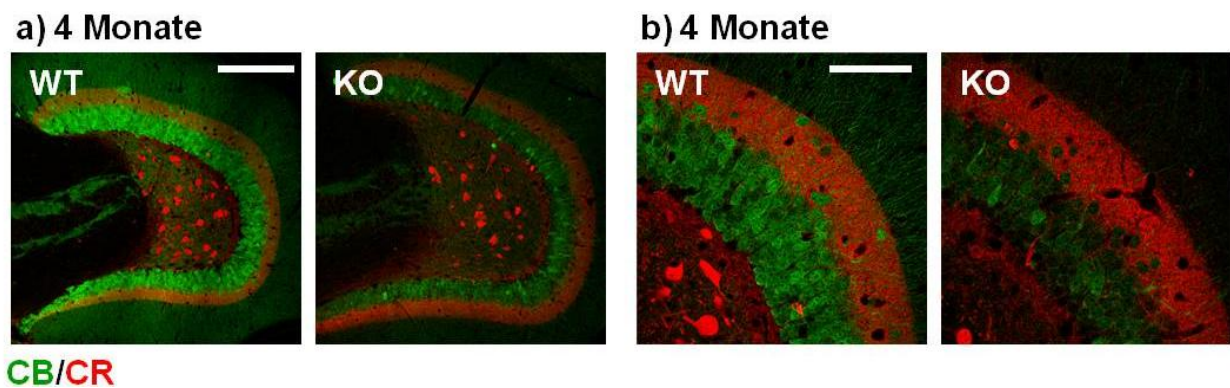
Abbildung 20: Gyrus Dentatus der Maus bei P10 (β Gal und Anti PRG-1 Färbung) (Skala: 50 μ m, Inset 15 μ m)

In keiner meiner Färbungen sah ich im heterozygoten Tier eine Kolo-kalisation von CR und β Gal im Gyrus Dentatus. In den homozygoten Knockout Mäusen jedoch fand ich sowohl bei P5 als auch bei P10 einzelne Ausnahmen dieser Regel: Dort existieren unreife Neurone, die sowohl β -Gal als auch CR exprimieren (Pfeile Abb., 21a+b). In den Färbungen der zehn Tage alten Tieren präsentiert sich das β Gal Signal ungewöhnlich

schwach, deswegen färbte ich zusätzlich mittels DAPI die Zellkerne/DNA in blau. (Abb.,21b)



Anschließend verglich ich im Gyrus Dentatus vier Monate alter Wildtypen und PRG-1 Knockout Mäusen das Verhältnis von CR zu CB positiven Zellen. Nebenbefundlich fiel mir die charakteristische Morphologie des Hippokampus auf. Anhand seiner Form kann ein geübtes Auge treffsicher Knockout- und Wildtypier auseinander halten (Abb., 22a). In der Vergrößerung (Abb., 22b) ist exemplarisch das unterschiedliche Erscheinungsbild der grünen CB Färbung bei gleichem Färbeprotokoll nebeneinandergestellt. Nicht nur sind die Körnerzellen im Knockout Tieren wesentlich schwächer gefärbt, auch die Dendriten stellen sich vereinzelt und blasser dar.



Die Schicht der CB positiven Zellen (Abb., 23a-c gepunktete Linie) ist im Wildtyp über alle Altersstufen breiter, im Knockout Tier hingegen dominiert der Durchmesser der CR positiven Zellschicht (Abb., 23a-c gestrichelte Linie).

Deutliche Unterschiede fallen beim Vergleich der Expression des Markers Doublecortin (DCX) im adulten Tier auf. Dieser ist ein Marker für die Neurogenese und wird spezi-

fisch von Säugetiergehirnen in neuronalen Vorläuferzellen und jungen Neuronen exprimiert. Während viele positive Zellen im Knockout zu finden sind, existieren, wenn überhaupt, nur wenige im Wildtyp. (Abb.23d)

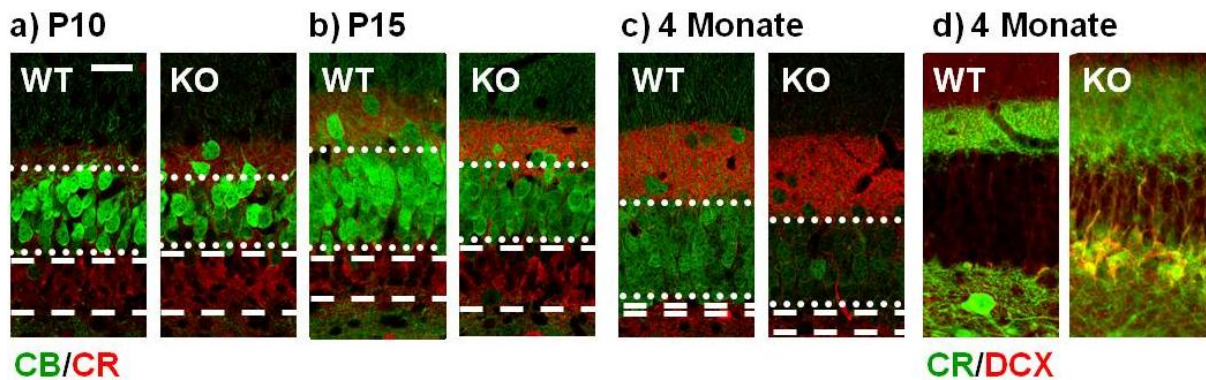


Abbildung 23: Calbindin/Calretinin Relation im Gyrus Dentatus (a-c gepunktete Linie: CB, gestrichelte Linie: CR; (d) Verhältnis von CR zu DCX im adulten Tier (Skala 15µm)

D Diskussion

D.1 Optimierung der immunhistochemischen Analysen

Um eine verlässliche Aussage über die Lokalisation von PRG-1 machen zu können, habe ich den in unserer Arbeitsgruppe hergestellten polyklonalen Antikörper gegen PRG-1 („Epitop624“) auf seine Spezifität untersucht. Dazu unterzog ich den Antikörper zahlreichen Negativkontrollen an PRG-1^{-/-} Mäusen um sicher zu stellen, dass dieser Antikörper nur PRG-1 erkennt. Diese Untersuchungen bildeten die Grundlage für die Lokalisationsstudien von PRG-1 bis auf Synapsenebene in der Lichtmikroskopie und für weitere Arbeiten in der Elektronenmikroskopie.

Da das PRG-1 Molekül in den Dendritendornen (dendritic spines) glutamaterger Neuronen lokalisiert ist und somit die Ursprungsneuronen, zu denen die Dendriten gehören, nicht eindeutig identifizierbar sind, wurde nach einer weiteren Methode gesucht, die PRG-1 exprimierenden Neuronen zu charakterisieren. Dabei wurde als Reporter gen für die PRG-1 Expression die Expression des aus dem gramnegativen Bakterium *Escherichia coli* stammenden Gens für die β -Galactosidase (β -Gal), genannt lacZ verwendet. Die β -Gal Kasette wurde mit dem Deletionskonstrukt im mutierten PRG-1 Gen eingefügt und wird mit dem PRG-1 Gen abgelesen. In der Etablierungsphase der β -Gal Färbung wurde der Antikörper in mehreren Verdünnungsstufen eingesetzt. Im Anschluss konnte ich in einer Entwicklungsstudie in Knockout Mäusen und am adulten Tier zeigen, dass die β Gal Färbung das gleiche Verteilungsmuster wie der PRG-1 Antikörper auf-

weist. Dabei wurden nur heterozygote Tiere verwendet um der Situation im Wildtyp Tier, das phänotypisch unauffällig ist, zu entsprechen.

Das Expressionslevel von PRG-1 wurde bei acht Entwicklungsstadien der Maus, von Zeitpunkt kurz vor der Geburt (E18) bis zum adulten Tier untersucht. Orientierend wurden drei Aussagen über die Stärke des PRG-1 Signals (keine, wenig, starke Expression) gemacht. Die β Gal Färbung trennt dabei zwischen strukturell verschiedenen Hirnregionen so fein, dass eine Zuordnung dieser Gehirnareale mühelos gelingt. Je nach Fragestellung konnte ich anhand der β -Gal Expression die Zelle, die PRG-1 exprimiert, oder PRG-1 in seiner physiologischen Position mithilfe des Antikörpers darstellen. Eine Kooperation mit Jan Baumgart ermöglichte außerdem die exakte Lokalisation von PRG-1 im physiologischen Zellverbund. In einem Wildtyp-Hirnschnitt würde der Antikörper alle ihn exprimierenden Neurone anfärben und damit die Zuordnung und Lokalisation des Moleküls zwischen benachbarten Zellen erheblich erschweren. Um mich auf einzelne, klar abgrenzbare, Neurone konzentrieren zu können, analysierte ich elektroporierte GFP-positive Zellen in einem Knockout Tier. Durch die Elektroporation eines PRG-1 exprimierenden Konstruktes konnte die PRG-1 Expression in einzelnen Neuronen wiederhergestellt werden. Elektrophysiologische Messungen in diesen GFP/PRG-1 positiven Neuronen (Kooperation mit der Gruppe von Dietmar Schmitz) zeigen eine komplette Wiederherstellung der normalen Wildtypperregungsleitung (Trimbuch et al., 2009), sodass sich meine Ergebnisse aus den in-Utero elektroporierten Tieren auf die Situation im Wildtyp übertragen lassen.

D.2 Das postsynaptisch lokalisierte PRG-1 moduliert die exzitatorische Transmission glutamaterger Neurone

Der erste Projektteil umfasste die Lokalisation von PRG-1 innerhalb eines Neurons im Hippokampus. Die Ergebnisse aus der konfokalen Mikroskopie und den 3D-Rekonstruktionen zeigen, dass PRG-1 nur in glutamatergen Neuronen exprimiert wird. Eine PRG-1 Expression wurde weder in Astrozyten, Oligodendrozyten, Mikrogliazellen, noch in inhibitorischen, GABAergen Neuronen gefunden. Weiterhin konnte ich zeigen, dass PRG-1 in den glutamatergen Neuronen ausschließlich in glutamatergen Synapsen an der postsynaptischen Dichte exprimiert wird. Im Verlauf bestätigten und ergänzten elektronenmikroskopische Aufnahmen die lichtmikroskopischen Resultate. Elektronenmikroskopische Studien zeigten, dass PRG-1 perisynaptisch an der postsynaptischen Dichte (PSD) asymmetrischer Synapsen lokalisiert ist.

In einer 3D Rekonstruktion einer Dreifachfärbung der präsynaptischen aktiven Zone und eines Markers für glutamaterge präsynaptische Endigungen konnte ich den LPA2 Rezeptor darstellen. Ich lokalisierte den Rezeptor somit, wie später elektronenmikroskopische Bilder bestätigten, auf der präsynaptischen Seite der inhibitorischen, glutamatergen Synapse.

In 3D Rekonstruktionen von CA1 Pyramidenzellen konnte ich darüber hinaus zeigen, dass auch das mutierte, funktionslose PRG-1 Konstrukt (H253K) korrekt in die Zellmembran eingebaut wird. Der Funktionsverlust erklärt sich folglich nicht, wie in heterologen Systemen von Sigal et al. 2007 für das PRG-3 Molekül vermutet, aus einer falschen Lage des mutierten Proteins im Neuron.

Meine exemplarischen anti-PRG-1 Färbungen in humanen Hippokampus- und Kortexschnitten unterschiedlichen Alters gleichen den Befunden in der Maus. Die von mir erhobenen Daten weisen darauf hin, dass PRG-1 auch beim Menschen auf der postsynaptischen Seite glutamaterger Neurone exprimiert wird. Es ist daher davon auszugehen, dass die tierexperimentellen Daten auf den Menschen übertragbar sind.

Die Tatsache, dass homozygot PRG-1 defiziente Mäuse konvulsive Anfälle zeigen und PRG-1 ausschließlich in Membranen glutamaterger Neurone gefunden wurde, lässt auf eine Beteiligung dieses Moleküls an der synaptischen Erregung glutamaterger Neurone schließen. Mutationen der extrazellulären Domäne von PRG-1, die für dessen Interaktion mit LPA zuständig sind, mindern seine Fähigkeit Phospholipide in Nervenzellen aufzunehmen und beeinträchtigen den Schutz gegen neuronale Übererregbarkeit durch überschüssiges synaptisches LPA. Die postsynaptische Maschinerie in PRG-1^{-/-} Mäusen scheint dagegen unverändert. Dass das Verabreichen von Lysophosphat Säure (LPA) auf LPA2-R-defizienten akuten Gehirnschnitten nicht zu einer Übererregbarkeit führt, deutet auf den LPA2 Rezeptor als Vermittler der neuronalen Übererregbarkeit in PRG-1^{-/-} Mäusen hin. Außerdem zeigen PRG-1/LPA2 Doppelknockout Mäuse ein physiologisches Erregungsmuster an der Synapse und im EEG (Trimbuch et al., 2009). Die Lokalisation von PRG-1 und des LPA2 Rezeptors half somit bei der Herleitung der Existenz eines neuen, post-präsynaptischen Signalwegs, auf den PRG-1 offensichtlich modulierend eingreift.

D.2.1 PRG-1 wird mit Beginn der glutamatergen Synaptogenese exprimiert

Nachdem ich die Position von PRG-1 an der Synapse bestimmt hatte, untersuchte ich an elektroporierten, GFP markierten Neuronen, wann dort erstmals PRG-1 exprimiert wird. Um den Einfluss der PRG-1 Expression auf die Entwicklung des Gehirnes und die Maturation eines einzelnen Neurons im Zellverband abschätzen zu können, wurden in diesen Studien ausschließlich CA1 Pyramidenzellen untersucht. Da der Reifungsprozess nicht in allen CA1 Pyramidenzellen zeitgleich, sondern über mehrere Tage verteilt abläuft (Tyzio R et al., 1999), habe ich in Kooperation mit Jan Baumgart bei E15,5 in-utero elektroporierte Mäuse mit GFP markierten Neuronen zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert. Der Beginn der Expression von PRG-1 in Neuronen, die bei E15,5 elektroporiert wurden, konnte auf den zweiten Tag nach der Geburt (P2) zeitlich lokalisiert werden.

3D Rekonstruktionen der P2 Pyramidenzellen zeigen eine für junge Neurone charakteristische Morphologie: Sie besitzen einen apikalen Dendriten, der sich nur spärlich verzweigt und das Stratum lacunosum-molekulare noch nicht erreicht hat. Ihre basalen Dendriten sind entweder nur sehr kurz oder noch nicht vorhanden. Diese jungen Neurone verfügen bereits über eine funktionelle, GABAerge Transmission, befinden sich jedoch in einer Phase, in welcher sich der glutamaterge Input gerade entwickelt (Tyzio R et al., 1999). Detailaufnahmen der P2 Dendriten zeigten die charakteristische Morphologie sich entwickelnder neuronaler Fortsätze und eine starke PRG-1 Expression entlang der Membranen der Dendriten. Die wenigen glutamatergen Synapsen des Stratum Radiatum befanden sich in verschiedenen Entwicklungsstufen. Sowohl in Schafsynapsen, welche als früheste Entwicklungsstadien angesehen werden, als auch in „Stubby Synapsen“, die eine Zwischenstufe in der Maturation repräsentieren (Filia et al 1998., Steward et al. 1991) konnte PRG-1 lokalisiert werden. Demnach wird PRG-1 vom frühesten Beginn der glutamatergen Synaptogenese an in den entstehenden Synapsen exprimiert.

Ultrastrukturellen Analysen, die in Kooperation mit Dr. Gregor Laube durchgeführt wurden, weisen ebenfalls darauf hin, dass PRG-1 bereits in frühesten Phasen der Ausbildung dendritischer Dornen (engl. spine), auf denen sich der Hauptanteil der glutamatergen Synapsen befindet, in verschiedenen Entwicklungsstadien präsent ist. Auch in diesen elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde PRG-1 auf der postsynaptischen Seite dendritischer Filopodien gesehen. Die fertige asymmetrische Synapse und

die sich ausbildende Synapse ohne komplette postsynaptische Dichte (PSD) zeigen multiple PRG-1 Punkte und ein starkes PRG-1 Signal, während Kontaktstellen bereits PRG-1 exprimieren. Im Gegensatz dazu wurde PRG-1 nicht in symmetrischen, inhibitorischen Synapsen gefunden.

Um die PRG-1 Expression und die Morphologie zu einem etwas weiter entwickelten Zeitpunkt zu untersuchen, habe ich die obigen Experimente mit drei Tage älteren (P5) Neuronen wiederholt. Zu diesem Zeitpunkt besitzen die CA-1 Neurone sowohl gut entwickelte basale Dendriten als auch Dendriten, die das Stratum lacunosum-molekulare erreichen. Bei P5 deutete die Morphologie der Neurone auf eine ausgereifte GABAerge und glutamaterge Transmission hin (Tyzio R, 1999). In diesen Neuronen war PRG-1 häufig im dendritischen Dornenkopf und postsynaptisch lokalisiert. Zu diesem Zeitpunkt bilden sich viele Synapsen, es fanden sich entsprechend dendritische Filopodien und dendritische Wachstumskegel („growth cones“). Die PRG-1 Expression war in diesen Strukturen sehr hoch, was auf eine wichtige Funktion in der Synapsenbildung hinweist.

D.3 PRG-1 Ausfall beeinflusst die neuronale Ausreifung im Hippokampus

Zur Klärung, ob PRG-1 eine Rolle bei der Synapsenbildung und Reifung von Neuronen spielt, wurden orientierende Färbungen von PRG-1^{-/-} Tieren angefertigt. Es fiel dabei auf, dass die Wildtyp-Schnitte im Mikroskop auch ohne Kenntnis des Genotyps exakt von den Knockout- Gehirnen unterschieden werden konnten. Die Form des Hippokampus PRG-1 defizienter Tiere unterscheidet sich charakteristisch von den wildtyp Tieren. Je älter die Tiere werden, umso eindeutiger und einfacher fiel die Zuordnung zum Genotyp. Diese morphologischen Unterschiede bestehen im Knockout Tier bereits vor dem elektrophysiologischem Auftreten der Anfälle.

Außerdem imponierte ein auffälliger Expressionsgradient des PRG-1 Signals im Hippocampus. Im Gyrus Dentatus werden die Körnerzellen größtenteils postnatal geboren (Altman J et al., 1990). In drei Färbungen, sowohl in der Dig in-situ, der β Gal als auch der PRG-1 Antikörperfärbung beginnt die PRG-1 Expression in den äußeren, älteren Schichten des Gyrus Dentatus, obwohl in allen Zellschichten Neurone vorhanden sind. Erst im adulten Tier wird in der Körnerzellschicht des Gyrus Dentatus PRG-1 durchgehend exprimiert. Auch Calbindin, hier ein Marker für reife Neurone, zeigt einen

vergleichbaren Gradienten, welcher exakt mit β Gal und dem PRG-1 "Epitop 624"-Antikörper kolokalisiert. Diese Daten zeigen, dass die PRG-1 Expression auf ausgereifte, glutamaterge Nervenzellen des Gyrus Dentatus beschränkt ist.

Der Vergleich der Färbungen zwischen Wildtyp und PRG-1^{-/-} Tieren zeigte zudem in PRG-1^{-/-}-Tieren mehr unreife Neurone in späteren Altersstufen als im Wildtyp. Diese Effekte sind noch weitgehend unverstanden.

D.4 Dynamik der PRG-1 Expression während der ZNS-Entwicklung

Im Anschluss an den Studien zur subzelluläre Lokalisation, zur elektrophysiologischen Charakterisierung und der Untersuchungen über der Regulation der neuronalen Erregbarkeit aus dem Zusammenspiel des präsynaptischen LPA-2 Rezeptors mit dem postsynaptischen PRG-1 (Trimbuch et al., 2009), rückte die Frage der systemischen Auswirkungen der Modulation der exzitatorischen neuronalen Transmission durch PRG-1 in den Vordergrund. Mich interessierte die regionale und entwicklungspezifische Verteilung von PRG-1 im Gehirn. Deswegen erstellte ich eine Übersichtskarte der ZNS-Verteilung von PRG-1 vom Embryonaltag 18 bis zum erwachsenen Tier. Aus der Beschreibung der PRG-1 armen bzw. reichen Areale lassen sich Hinweise auf dessen Rolle im ZNS ableiten.

Ein Augenmerk legte ich auf das olfaktorische System, welches hintereinander glutamaterge Projektionen auf glutamaterge Neurone enthält. Dort sollten sich systemisch detektierbare Defizite in der neuronalen Verschaltung finden lassen.

D.4.1 Die neuronale Vernetzung im Kortex

Die PRG-1 Expression im sich entwickelnden Kortex verfolgt eine interessante Dynamik: Am Tag der Geburt erscheint das PRG-1 Signal nur in den tiefen kortikalen Schichten. Am fünften postnatalen Tag 5 (P5) und bei P10 ist es bereits in den pialen Schichten präsent. Dieses Verteilungsmuster ähnelt auffallend der Entwicklung der Kortexschichten von innen nach außen (inside-out development) (Rakic et al., 1995).

Etwa in der zweiten Woche nach der Geburt (P15) erreicht die Synptogenese von asymmetrischen (erregenden) Synapsen im somatosensorischen Barrel Field und im primären visuellen Kortex ihren Höhepunkt. Dieser Entwicklungsschritt wird von einem Höchstwert in der PRG-1 Signalstärke, dargestellt mithilfe der β Gal Färbung, begleitet.

Während das Gehirn ausreift, werden synaptische Kontakte präzisiert. Dabei reduziert sich im adulten Gehirn die Synapsendichte (Blue et al., 1983), (White et al., 2002),

(Bourgeois et al., 1993), (Zecevic et al., 1991). Zeitlich parallel dazu ändert sich auch das PRG-1 Muster. Während es bei P15 in allen Kortexschichten existiert, wird das Molekül im erwachsenen Tier auf die „input“ Schichten II und IV reduziert. Ein vergleichbarer synaptogenetischer Gradient, der auf einer schichtspezifischen neuronalen Ausreifung fußt, wurde im visuellen Kortex (Voigt et al., 1993) und im somatosensorischen Kortex der Ratte (Kristt et al., 1978) gefunden. Dort ist jedes Barthaar somatotypografisch in seiner eigenen Einheit (barrel) organisiert. Aus diesem Grund trägt dieser Kortex seinen Namen: Barrel Field (Petersen et al., 2007). Interessanterweise zeigt die PRG-1 Verteilung in Schicht IV des somatosensorischen Kortex (S1BF) eine Form, die an die typischen Fässchen erinnert, die für diese Kortexregion charakteristisch sind. Diese Fässchenform lässt sich ab P5 erstmals erahnen und demarkiert sich deutlich im erwachsenen Tier. Starke PRG-1 Präsenz in den mutmaßlichen Fässchenneuronen und geringere Expression in den Septen im adulten Gehirn gehen konform mit einer aktivitätsabhängigen Reorganisation des somatosensorischen Barrelkortex (S1BF) (Inan et al., 2007). Die Parallelen zwischen der Reifung dieser Neurone im visuellen Kortex (V1), im somatosensorischen Barrelkortex (S1BF) und der PRG-1 Expression, lassen eine Beteiligung in der Ausbildung und Verknüpfung der lokalen Netzwerke vermuten.

Im Thalamus und Hypothalamus zeigt die PRG-1 Expression zwar ebenfalls einen kurvenförmigen Verlauf. Die Expression war jedoch so gleichmäßig, dass ich zwischen benachbarten Kernen nicht unterscheiden konnte. Interessanterweise stechen der ventrale posteriore laterale und mediale Kern (VPL und VPM) hervor. Die Expression setzt dort verzögert ein und verbleibt auf einem im Vergleich zum übrigen Thalamus niedrigen Level.

Die ultrastrukturellen Analysen, die in Kooperation mit Dr. Gregor Laube durchgeführt wurden, weisen darauf hin, dass PRG-1 bereits in frühesten Phasen der Ausbildung glutamaterger dendritischer Dornen (engl. spine) präsent ist. Der von mir gezeigte Schwerpunkt von PRG-1 in sensorischen Kortexarealen mit aktivitätsabhängiger Reorganisation (engl. refinement), z.B. im Barrelkortex (Inan et al., 2007) unterstreicht dessen Rolle in der Regulation exzitatorischer Transmission (Trimbuch et al., 2009). Die frühe synaptische Expression deutet darauf hin, dass PRG-1 eine wichtige Rolle bei der synaptischen Organisation dieser Regionen spielt.

D.4.2 Mangel an PRG-1 beeinflusst das olfaktorische System

Nachdem sich die Bedeutung von PRG-1 in einer generellen Modifizierung des Erregungslevels im ZNS herausbildete, rückte in einem weiteren Teilprojekt die systemische Wirkung von PRG-1 in den Blickpunkt des Interesses. Die Untersuchungen über die entwicklungsabhängige Dynamik der PRG-1 Expression veranlassten uns, in Kombination mit dem spezifischen Vorkommen in definierten Kortexregionen, den Einfluss der PRG-1 Defizienz auf das Verhalten durch die veränderte Wahrnehmung und womöglich Verarbeitung taktiler Reize zu untersuchen. Orientierend untersuchte ich das olfaktorische System, in dem nacheinander glutamaterge Neurone auf glutamaterge Nervenzellen projizieren.

Die genaue Verarbeitung der in den Duftmolekülen enthaltenen Information, ist, ebenso wie der exakte Aufbau der Riechbahn, nicht bis ins letzte Detail bekannt. Über die beteiligten Hirnregionen und ihre mutmaßliche Verschaltung untereinander existiert eine grobe Vorstellung: Die Signale werden vom olfaktorischen Neuroepithel in den olfaktorischen Hauptbulbus (Main Olfactory Bulb (MOB)) übertragen und dann in den primären olfaktorischen Kortex weitergeleitet. Benachbart existiert das akzessorische olfaktorische System für die Verarbeitung der Pheromone, die im Tierreich bei der Partnersuche und Fortpflanzung eine entscheidende Rolle spielen. (Paxinos: The Rat nervous System, Third Edition, Chapter 29: 923-964). Zwei Tage vor Geburt der Mäuse fand ich PRG-1 in der Mitralzellschicht im Main Olfaktoroy Bulb (MOB). Ab Tag Fünf weitet sich die PRG-1 Expression auf die Körnerzellschicht aus.

Den MOB verlässt der laterale olfaktorische Trakt zu den verschiedenen Teilen des primären olfaktorischen Kortex. Die Duft-Diskrimination und Integration verlaufen vom olfaktorischen Epithel, über die Mitral- und „gefiederten“ (engl. tufted) Zellen im MOB weiter zum primären olfaktorischen Kortex und dann über den medialen Thalamuskern zum posterioren orbitofrontalen Kortex. In den verschiedenen Abschnitten des primären olfaktorischen Kortex ließ sich eine frühe und auffallend starke PRG-1 Expression nachweisen. Diese war sowohl im eigentlichen als auch im akzessorischen System zu finden.

Bekannt sind mehrere hintereinander geschaltete, glutamaterge Übersetzungen: Vom olfaktorischen Epithel auf die Mitral.- und Tuftedzellen, sowie vom lateralen olfaktorischen Trakt weiter in den primären Kortex. Vermutet wird außerdem eine glutamaterge

Übertragung vom medialen Thalamus zum posterioren orbitofrontalen Kortex. Eine unentbehrliche Rolle von PRG-1 im olfaktorischen System liegt durch seine starke Expression in allen beteiligten Strukturen nahe. Ich vermutete darüber hinaus in PRG-1 Knockout Mäusen Summationseffekte der gestörten Glutamat-Verschaltung und damit detektierbare Verhaltensänderungen.

In Kooperation mit dem Institut für Anatomie der Medizinischen Fakultät Magdeburg ließen sich diese Annahmen bekräftigen: Die PRG-1^{-/-} Mäuse sind aktiver bzw. ruheloser als die Wildtypen und zeigen weniger Angst als ihre Geschwister. Passend dazu fand ich eine starke und frühe Expression von PRG-1 in der Amygdala und im Hippokampus.

Ein Angst-Versuch, bei dem die Mäuse einem Fuchsduft (2,3,5-trimethyl-3-thiazoline (TMT)) ausgesetzt wurden, zeigte, dass die PRG-1^{-/-} Tiere eine verminderte Angstreaktion aufwiesen. Dieser Befund ließ vermuten, dass die PRG-1^{-/-} Mäuse den TMT-Geruch nicht wahrnehmen können oder dass die Tiere eine zentrale Verarbeitungsstörung des wahrgenommenen Geruchs haben. Diese Frage, die durch meine Untersuchungen aufgeworfen wurde, führte zu einer Reihe weiterer Untersuchungen, die sich damit beschäftigen, ob die primäre Sinneswahrnehmung der PRG-1^{-/-} gestört ist oder ob das Fehlen von PRG-1 zu einer höheren kortikalen Verarbeitungsstörung führt.

E Zusammenfassung

In meiner Arbeit beschrieb ich immunhistochemisch die Expression des Plasticity-Related Gene-1 (PRG-1) in charakteristischen perinatalen und postnatalen Entwicklungsstadien der Maus. Dazu etablierte ich am Konfokalen- und am Lichtmikroskop die Färbung mit β Gal im heterozygoten PRG-1 Tier und entwickelte ein neues Protokoll für den PRG-1 Antikörper im wildtyp Tier. Außerdem erstellte ich zur genauen Proteinlokalisierung 3D Rekonstruktionen von konfokalen Schnittbildern. Grundlegende Erkenntnisse überprüfte ich exemplarisch an humanen Schnitten und fand Hinweise darauf, dass die Ergebnisse aus dem Mausmodell sich auf den Menschen übertragen lassen.

PRG-1 wurde lediglich in glutamatergen Neuronen gefunden, in denen es die postsynaptische Membran glutamaterger Synapsen flankierte. Ich zeigte, dass auch das mutierte, funktionslose PRG-1 Molekül (H235K) bei einer Rekonstitution in PRG-1^{-/-} Mäusen mittels in-utero Elektroporation in der Membran eingebaut wird. Darüber hinaus lo-

kalisierte ich durch 3D Rekonstruktionen den mutmaßlichen Interaktionspartner von PRG-1, den LPA-2 Rezeptor, an der Präsynapse glutamaterger Neurone. In Kooperationen konnte ich dadurch dazu beitragen, morphologische Daten zu einem neuen post-präsynaptischen Mechanismus in der synaptischen Erregungsmodulation beizusteuern. Ultrastrukturelle Entwicklungsanalysen, die durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigt wurden, zeigen zudem, dass PRG-1 zu einem sehr frühen Zeitpunkt der glutamatergen Synapsenreifung exprimiert wird. Sie legen seine potentiell wichtige Rolle in diesem Prozess nahe. Letztendlich zeigten meine Färbungen zur neuronalen Ausreifung im Gyrus Dentatus Veränderungen, die bei Abwesenheit von PRG-1 auftreten und auf seine Beteiligung hinweisen könnten.

In einem weiteren Projektteil untersuchte ich das intrakranielle und entwicklungspezifische PRG-1 Vorkommen. Dafür erstellte ich einen „Atlas“ der PRG-1 Expression von der perinatalen Entwicklung bis zum erwachsenen Tier und beschrieb darin die Stärke der PRG-1-Expression in unterschiedlichen kortikalen und subkortikalen Arealen. Kurz zusammengefasst durchläuft PRG-1 peri- und postnatal eine dynamische Expression, die für die einzelnen Hirnregionen charakteristisch und spezifisch ist.

In „Input“ Neuronen des Kortex, speziell in der Schicht IV, im Hippokampus und im olfaktorischen System, welches aufeinanderfolgend glutamaterge Projektionen auf glutamaterge Neurone besitzt, wies ich ein durchgehend starkes und sehr früh einsetzendes PRG-1 Signal nach. Die dynamische PRG-1 Expression in kortikalen Regionen, die an der sensorischen Wahrnehmung beteiligt sind, spiegelt die synaptische Organisation wider. Im erwachsenen Tier beschränkt sich das Signal schließlich auf die Haupt-Input-Schichten/Neurone des Kortex. Bei Abwesenheit von PRG-1 zeigten Mäuse in einer Kooperation mit dem Institut für Anatomie in Magdeburg signifikante Verhaltensänderungen bei Angstversuchen. Diese Versuche warfen die Frage auf, ob in den PRG-1^{-/-} Mäusen die primäre sensorische Sinneswahrnehmung oder die höhere kortikale Verarbeitung der aufgenommenen Sinnesreize gestört ist.

Insgesamt konnte ich einige Fragen zur PRG-1 Expression beantworten, seine Rolle im ZNS beleuchten und zudem Anhaltspunkte für zukünftige Untersuchungen schaffen.

F Literaturverzeichnis

- Altman J, Bayer SA. 1990.** Prolonged sojourn of developing pyramidal cells in the intermediate zone of the hippocampus and their settling in the stratum pyramidale. *J Comp Neurol.* 1990, 301, S. 343-364.
- Anliker, B, Chun, J. 2004.** Cell surface receptors in lysophospholipid signaling. *Semin Cell Dev Biol.* 2004, 15(5), S. 457-465.
- Bachner, D., et al. 1999.** Developmental expression analysis of murine autotaxin (ATX). *Mech Dev.* 1999, 84(1-2), S. 121-125.
- Balazs, L., et al. 2001.** Topical application of the phospholipid growth factor lysophosphatidic acid promotes wound healing in vivo. *Am J Physiol Regul Integr.* 2001, 280(2), S. R466-72.
- Bandoh, K., et al. 1999.** Molecular cloning and characterization of a novel human G protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid. *J Biol Chem.* 1999, 274(39), S. 27776-85.
- Blue ME, Parnavelas JG. 1983.** The formation and maturation of synapses in the visual cortex of the rat. II. Quantitative analysis. *J Neurocytol.* 1983, 12, S. 697-712.
- Bourgeois JP, Rakic P. 1993.** Changes of synaptic density in the primary visual cortex of the macaque monkey from fetal to adult stage. *J Neurosci.* 1993, 13, S. 2801-2820.
- Bräuer, A.U. and R. Nitsch. 2008.** Plasticity-related genes (PRGs/LRPs): A brain-specific class of lysophospholipid-modifying proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2008, 1781 (9), S. 595-600.
- Bräuer, A.U., et al. 2003.** A new phospholipid phosphatase, PRG-1, is involved in axon growth and regenerative sprouting. *Nat Neurosci.* 2003, 6 (6), S. 572-578.
- Brindley, D.N., et al. 2002.** Lipid phosphate phosphatases regulate signal transduction through glycerolipids and sphingolipids. *Biochim Biophys Acta.* 2002, 1582(1-3), S. 33-44.
- Brindley, D.N., 2004.** Lipid phosphate phosphatases and related proteins: signaling functions in development, cell division, and cancer. *J Cell Biochem.* 2004, 92 (5), S. 900-912.
- Brindley, D.N., Waggoner, D.W. 1998.** Mammalian lipid phosphate phosphohydrolases. *J Biol Chem.* 1998, 273(38), S. 24281-4.
- Caroni, P. 1997.** Overexpression of growth-associated proteins in the neurons of adult transgenic mice. *J Neurosci Meth.* 1997, 71, S. 3-9.
- Cascales, C., E.H. Mangiapane, and D.N. Brindley. 1984.** Oleic acid promotes the activation and translocation of phosphatidate phosphohydrolase from the cytosol to particulate fractions of isolated rat hepatocytes. *Biochem J.* 1984, 219(3), S. 911-916.
- Dillon, D.A., et al. 1997.** Mammalian Mg²⁺-independent phosphatidate phosphatase (PAP2) displays diacylglycerol pyrophosphate phosphatase activity. *J Biol Chem.* 1997, 272(16), S. 10361-10366.
- Filia JC, et al. 1998.** Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *J Neurosci.* 1998, 18, S. 8900-8911.
- Fukushima, N., et al. 2001.** Lysophospholipid receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001, 41, S. 507-534.
- Gordon, et al. 1987.** Regulation of Thy-1 gene expression in transgenic mice. *Cell.* 1987, 50, S. 454-452.
- Hecht, J.H., et al. 1996.** Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *J Cell Biol.* 1996, 135(4), S. 1071-1083.
- Inan, M Crair, MC. 2007.** Development of cortical maps: perspectives from the barrel cortex. *Neuroscientist.* 2007, 13, S. 49-61.
- Ishii, I., et al. 2000.** Functional comparisons of the lysophosphatidic acid receptors, LP(A1)/VZG-1/EDG-2, LP(A2)/EDG-4, and LP(A3)/EDG-7 in neuronal cell lines using a retrovirus expression system. *Mol Pharmacol.* 2000, 58(5), S. 895-902.

- Ishii, I., et al.. 2004.** Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annu Rev Biochem.* 2004, 73, S. 321-354.
- Jamal, Z., et al. 1991.** Plasma membrane fractions from rat liver contain a phosphatidate phosphohydrolase distinct from that in the endoplasmic reticulum and cytosol. *J Biol.* 1991, 266(5), S. 2988-2996.
- Kai, M., et al. 1996.** Identification and cDNA cloning of 35-kDa phosphatidic acid phosphatase (type 2) bound to plasma membranes. Polymerase chain reaction amplification of mouse H₂O₂-inducible hic53 clone yielded the cDNA encoding phosphatidic acid phosphatase. *J Biol Chem.* 1996, 271(31), S. 18931-8.
- Kranenburg, O. and W.H. Moolenaar. 2001.** Ras-MAP kinase signaling by lysophosphatidic acid and other G protein-coupled receptor agonists. *Oncogene.* 2001, 20(13), S. 1540-6.
- Kristt, DA. 1978.** Neuronal differentiation in somatosensory cortex of the rat. I. Relationship to synaptogenesis in the first postnatal week. *Brain Res.* 1978, 150, S. 467-486.
- Lee, C.W., et al. 2006.** GPR92 as a new G_{12/13}- and G_q-coupled lysophosphatidic acid receptor that increases cAMP, LPA5. *J Biol Chem.* 2006, 281(33), S. 23589-97.
- Lummen, G., et al. 1997.** Identification of G protein-coupled receptors potently stimulating Identification of G protein-coupled receptors potently stimulating. *Naunyn Schmiedebergs Arch.* 1997, 356(6), S. 769-776.
- McDermott, M.I., et al. 2004.** Is PRG-1 a new lipid phosphatase? *Nat Neurosci.* 2004, 7(8), S. 789; author reply 789-90.
- Mills, G.B. and W.H. Moolenaar. 2003.** The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003, 3(8), S. 582-591.
- Monkin, M, Keifer, J. 2006.** Quantitative analysis of immunofluorescent punctate. *J Neurosci Meth.* 2006, 157, S. 218-224.
- Moolenaar, W.H. 1999.** Bioactive lysophospholipids and their G protein-coupled receptors. *Exp Cell Res.* 1999, 253(1), S. 230-238.
- Moolenaar, W.H., L.A. van Meeteren, and B.N. Giepmans. 2004.** The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *Bioessays.* 2004, 26(8), S. 870-881.
- Morris, RJ, et al. 1992.** Thy-1, the enigmatic extrovert on the neuronal surface. *BioEssays.* 1992, 14, S. 715-722.
- Neidlinger, N.A., et al. 2006.** Hydrolysis of phosphatidylserine-exposing red blood cells by secretory phospholipase A₂ generates lysophosphatidic acid and results in vascular dysfunction. *J Biol Chem.* 2006, 281(2), S. 775-781.
- Petersen, CC. 2007.** The functional organisation of the barrel cortex. *Neuron.* 2007, 56, S. 339-355.
- Rakic, VS Caviness, P. 1995.** Cortical development: view from neurological mutants two decades later. *Neuron.* 1995, 14, S. 1101-1104.
- Rouach, et al. 2005.** TARP gamma-8 controls hippocampal AMPA receptor number, distribution and synaptic plasticity. *Nature Neurosci.* 2005, 8(11), S. 1525-33.
- Schumacher, K.A., H.G. Classen, and M. Spath. 1979.** Platelet aggregation evoked in vitro and in vivo by phosphatidic acids and lysoderivatives: identity with substances in aged serum (DAS). *Thromb Haemost.* 1979, 42(2), S. 631-640.
- Sigal, Y.J., M.I. McDermott, and A.J. Morris,. 2005.** Integral membrane lipid phosphatases/phosphotransferases: common structure and diverse functions. *Biochem J.* 2005, 387(Pt 2), S. 281-293.
- Smith, M.E., et al. 1967.** The role of phosphatidate phosphohydrolase in glyceride biosynthesis. *Eur J Biochem.* 1967, 3(1), S. 70-77.
- Smith, S.W., S.B. Weiss, and E.P. Kennedy. 1957.** The enzymatic dephosphorylation of phosphatidic acids. *J Biol Chem.* 1957, 228(2), S. 915-922.
- Starz-Gaiano, M., et al., 2001.** Spatially restricted activity of a Drosophila lipid phosphatase guides migrating germ cells. *Development.* 2001, 128(6), S. 983-991.
- Steward O, Falk PM. 1991.** Selective localisation of polyribosomes beneath developing synapses: a quantitative analysis of the relationships between polyribosomes and developing synapses in the hippocampus and dentate gyrus. *J Comp Neurol.* 1991, 314, S. 545-557.

- Stracke, M.L., et al. 1992.** Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *J Biol Chem.* 1992, 267(4), S. 2524-9.
- Stukey, J. and G.M. Carman. 1997.** Identification of a novel phosphatase sequence motif. *Protein Sci.* 1997, 6(2), S. 469-72.
- Sturm, A. and A.U. Dignass. 2002.** Modulation of gastrointestinal wound repair and inflammation by phospholipids. *Biochim Biophys Acta.* 2002, 1582(1-3), S. 282-288.
- Tanaka, M., et al. 2006.** Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid. *J Biol Chem.* 2006, 281(35), S. 25822-30.
- Tokumura, A. et al. 2002.** Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase. *J Biol Chem.* 2002, 277(42), S. 39436-42.
- Tokumura, A., et al. 1981.** Lysophosphatidic acid-induced aggregation of human and feline platelets: structure-activity relationship. *Biochem Biophys Res Commun.* 1981, 99(2), S. 391-398.
- Tokumura, A., et al. 1986.** Involvement of lysophospholipase D in the production of lysophosphatidic acid in rat plasma. *Biochim Biophys Acta.* 1986, 875(1), S. 31-38.
- Trimbuch, et al. 2009.** Synaptic PRG-1 modulates excitatory transmission via lipid phosphate-mediated signaling. *Cell.* 2009, 138, S. 1222-1235.
- Tyzio R, et al. 1999.** The establishment of GABAergic and glutamatergic synapses on CA1 pyramidal neurons is sequential and correlates with the development of the apical dendrite. *J Neurosci.* 1999, 19, S. 10372-10382.
- van Corven, E.J., et al. 1989.** Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins. *Cell.* 1989, 59(1), S. 45-54.
- van der Bend, R.L., et al. 1992.** Identification of a putative membrane receptor for the bioactive phospholipid, lysophosphatidic acid. *Embo J.* 1992, 11(7), S. 2495-2501.
- van Meeteren, L.A. and W.H. Moolenaar. 2007.** Regulation and biological activities of the autotaxin-LPA axis. *Prog Lipid Res.* 2007, 46(2), S. 145-160.
- van Meeteren, L.A., et al. 2006.** Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol Cell Biol.* 2006, 26(13), S. 5015-22.
- Vogt, W. 1957.** Pharmacologically active lipidsoluble acids of natural occurrence. *Nature.* 1957, 179(4554), S. 300-304.
- Vogt, W. 1963.** Pharamacologically active acidic phospholipids and glycolipids. *Biochem.* 1963, 12, S. 415-420.
- . 1957.** The chemical nature of Darmstoff. *J Physiol.* 1957, 137(1), S. 154-167.
- Voigt T, et al. 1993.** Synaptophysin immunocytochemistry reveals inside-out pattern of early synaptogenesis in ferret cerebral cortex. *J Comp Neurol.* 1993, 330, S. 48-64.
- White, HS. 2002.** Animal models of epileptogenesis. *Neurology.* 2002, 59, S. 7-14.
- Zecevic N, Rakic P. 1991.** Synaptogenesis in monkey somatosensory cortex. *Cereb Cortex.* 1991, 1, S. 510-523.
- Zhang, N., J.P. Sundberg, and T. Gridley. 2000.** Mice mutant for Ppap2c, a homolog of the germ cell migration regulator wunen, are viable and fertile. *Genesis.* 2000, 27(4), S. 137-140.
- Zhang, Q.X., et al. 2000.** Identification of structurally important domains of lipid phosphate phosphatase-1: implications for its sites of action. *Biochem J.* 2000, 345 Pt 2, S. 181-4.

G Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

H Poster, Vorträge und Publikationen

Poster:

Role of PRG-1 in hippocampal excitability and epilepsy.

6th FENS forum of European neuroscience. 12. - 16. Juli 2008, Genf, Schweiz.

Trimbuch T, Beed P, Vogt J, Ninnemann O, Schuchmann S, Schuelke M, Baumgart J, **Streu N**, Geist B, Schlueter L, Meier N, Brunk I, Ahnert-Hilger G, Birchmeier C, Sendtner M, Braeuer AU, Schmitz D and Nitsch R.

Vorträge:

Plasticity Related Gene 1 (PRG-1) expression in the adult and developing brain

19. European Students Conference (ESC), 29.September – 03.Oktober 2008, Berlin

Streu N, Trimbuch T, Ninnemann O, Vogt J, Nitsch R

Plasticity related gene-1 (PRG-1) expression in the adult and developing mouse brain, Models of Neurodegenerative Diseases, June 1-10, 2009, Kuopio, Finland

Streu N, Trimbuch T, Nitsch R, Vogt J

Publikationen:

Plasticity Related Gene 1 (PRG-1) expression in the adult and developing brain

Eur J Med Res 13(Supplement I): I-XX, 94/95(2008)

Streu N, Trimbuch T, Ninnemann O, Vogt J, Nitsch R

PRG-1 is a novel player at the synapse, modulating excitatory transmission via lipid phosphate-mediated signaling. *Cell* 2009

Trimbuch T, Beed P, Vogt J, Schuchmann S, Maier N, Kintscher M, Breustedt J, Schuelke- Gerstenfeld M, **Streu N**, Kieselmann O, Brunk I, Laube G, Strauss U, Battefeld A, Wende H, Birchmeier C, Wiese S, Sendtner M, Kawabe H, Kishimoto-Suga M, Brose N, Baumgart J, Geist B, Aoki J, Savaskan NE, Bräuer AU, Chun J, Ninnemann O, Schmitz D and Nitsch R

Homeostatic regulation of NCAM polysialylation is critical for correct synaptic targeting *Cell Mol Life*

Sci. 2012 Apr;69(7):1179-91. Epub 2011 Nov 9

Vogt J, Glumm R, Schlüter L, Schmitz D, Rost BR, **Streu N**, Rister B, Suman Bharathi B, Gagiannis D, Hildebrandt H, Weinhold B, Mühlhoff M, Naumann T, Savaskan NE, Brauer AU, Reutter W, Heimrich B, Nitsch R, Horstkorte R.

I Selbstständigkeitserklärung

„Ich, **Nora-Regina Streu**, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **„Lokalisation von Plasticity Related Gene-1 (PRG-1) im Gehirn der Maus“** selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

J Danksagung

Mein besonderer Dank geht zuallererst an Prof. Nitsch, der die Expedition Promotion erst ermöglichte und ihr über die Jahre den Rücken freihielt. Außerdem danke ich Dr. Vogt, der mich im Anatomiekurs „entdeckte“ und bis zum Examen, institutsübergreifend durch alle Höhen und Tiefen begleitete. Es gab neben viel Gesprächsstoff auch immer ein offenes Ohr für mich.

Natürlich darf ich meine Mitstreiter aus dem Institut für Anatomie der Charité nicht vergessen. Ich verzichte darauf alle namentlich zu erwähnen, fühlen sich alle kleinen und großen Helfer bitte angesprochen. Ohne „das Team“ wäre jeder einzelne nicht so weit gekommen!

Letztendlich, aber ohne wertende Reihenfolge, ist mein privates Umfeld zu erwähnen. Welchem die mühevollen Aufgabe zukam, mich punktgenau zu unterstützen, zur Arbeit oder zur Ruhepause anzuhalten und geduldig alle Begleitumstände zu ertragen.