

# **Die Rolle von PRG-1 bei axonalem Auswachsen und der Spinebildung**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Leslie Schlüter**

aus Karlsruhe

Berlin

Mai 2010

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Juli 2005 bis Mai 2010 im Institut für Zell- und Neurobiologie, Centrum für Anatomie, Charité-Universitätsmedizin Berlin und unter der Leitung von Prof. Dr. Robert Nitsch angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Constanze Scharff
2. Gutachter: Prof. Dr. Robert Nitsch

Disputation am: 28.09.2010

# Inhaltsverzeichnis

|                              |  |
|------------------------------|--|
| <b>Inhaltsverzeichnis</b>    | <b>I</b>   |
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b> | <b>V</b>   |
| <b>Zusammenfassung</b>       | <b>VIII</b>  |
| <b>Summary</b>               | <b>X</b>   |
| <br>                         |  |
| <b>A</b>                     | <b>Einleitung</b>                                      |
| <b>1</b>                     | <b>1</b>   |
| A.1                          | Das Nervensystem                                       |
| A.2                          | Polarisierung  |
| A.3                          | Dendriten und Spines                                   |
| A.4                          | Das Axon   |
| A.5                          | Netzwerkbildung und axonales Auswachsen im Hippokampus |
| A.5.1                        | Leitmoleküle   |
| A.5.2                        | Lysophosphatsäure                                      |
| A.6                          | Intrazelluläre Signale & Aktinmobilisierung            |
| A.6.1                        | Ca <sup>2+</sup> -Konzentration                        |
| A.6.2                        | GTPasen  |
| A.6.3                        | PI3K/Akt-Signalweg                                     |
| A.7                          | Plasticity Related Gene-1                              |
| A.7.1                        | Struktur und Eingruppierung von PRG-1                  |
| A.7.2                        | Die Expression und mögliche Funktion von PRG-1         |
| A.8                          | Technischer Hintergrund                                |
| A.8.1                        | EGFP transgene Mäuse                                   |
| A.8.2                        | 2-Photonen-Laserrastermikroskopie (2PLSM)              |
| A.9                          | Ziel der Arbeit  |
| <br>                         |  |
| <b>B</b>                     | <b>Material und Methoden</b>                           |
| <b>20</b>                    | <b>20</b>  |
| B.1                          | Material   |
| B.1.1                        | Chemikalien und Medien                                 |
| B.1.2                        | Kits   |
| B.1.3                        | Zubehör  |
| B.1.4                        | Geräte und Software                                    |

---

|          |  |    |
|----------|--|----|
| B.1.5    | Versuchstiere, Zellen, Bakterien                                   | 24 |
| B.1.6    | Antikörper   | 25 |
| B.1.7    | Inhibitoren  | 25 |
| B.1.8    | Konstrukte   | 26 |
| B.1.9    | Kulturmedium   | 26 |
| B.1.10   | Puffer und Lösungen  | 27 |
| B.2      | Molekularbiologische Methoden                                      | 33 |
| B.2.1    | Genotypisierung transgener Tiere mittels UV-Licht                  | 33 |
| B.2.2    | Präparation genomischer DNA aus Biopsien von Mäuseschwänzen        | 33 |
| B.2.3    | Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)            | 34 |
| B.2.4    | Agarose-Gelelektrophorese  | 35 |
| B.2.5    | Hitzetransformation  | 36 |
| B.2.6    | DNA-Minipräparation und Glycerolkulturen                           | 36 |
| B.2.7    | DNA-Maxipräparation  | 36 |
| B.2.8    | Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren          | 37 |
| B.3      | Zellbiologische Methoden   | 37 |
| B.3.1    | Organotypische Schnittkulturen                                     | 37 |
| B.3.1.1  | Kollagenkulturen   | 37 |
| B.3.1.2  | Ko-Kulturen  | 38 |
| B.3.2    | Präparation primärer Neurone aus dem Hippokampus embryonaler Mäuse | 38 |
| B.3.3    | Kultivierung und Passagieren von HEK293-Zellen                     | 39 |
| B.3.4    | CaCl <sub>2</sub> -Transfektion                                    | 39 |
| B.3.5    | Transfektion mit Effectene   | 40 |
| B.3.6    | Immunhistologie  | 41 |
| B.3.6.1  | Direkte Methode  | 41 |
| B.3.6.2  | Indirekte Methode  | 41 |
| B.3.7    | Transkardiale Perfusion  | 42 |
| B.3.8    | Anfertigung von Gewebeschnitten                                    | 42 |
| B.3.9    | Vitalitäts-Nachweis mit Propidiumjodid                             | 43 |
| B.3.10   | Mikroskopie  | 43 |
| B.3.10.1 | Inverse Mikroskopie  | 43 |
| B.3.10.2 | Fluoreszenzmikroskopie   | 43 |
| B.3.10.3 | Konfokale Fluoreszenzmikroskopie                                   | 44 |
| B.3.10.4 | 2-Photonen-Mikroskopie, Life-imaging                               | 44 |
| B.3.11   | Statistische Verfahren   | 46 |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>C</b> | <b>Ergebnisse</b>   | <b>47</b> |
| C.1      | Axonale Auswachsanalysen PRG-1 defizienter Mäuse  | 47        |
| C.1.1    | PRG-1 defiziente Mäuse zeigen ein geringeres Einwachsen von entorhinalen Fasern in den Hippokampus            | 49        |
| C.2      | Dynamische axonale Auswachsanalysen PRG-1 defizienter Mäuse mit Hilfe von Zeitraffer-Aufnahmen                | 52        |
| C.2.1    | Vitalitätsnachweis  | 53        |
| C.2.2    | Messung der Einwachsgeschwindigkeit von entorhinalen Fasern   | 54        |
| C.2.3    | Die Auswachsgeschwindigkeiten der Axone von $\beta$ -aktin Mäusen und Thy-17 Mäusen unterscheiden sich nicht  | 57        |
| C.2.4    | Axone PRG-1 defizienter Mäuse zeigen ein langsames Einwachsen in den Hippokampus als Wildtyp Mäuse            | 58        |
| C.3      | PRG-1 ist nicht auf auswachsenden Axonen lokalisiert  | 59        |
| C.4      | Das Auswachsverhalten PRG-1 defizienter Fasern ist aktivitätsabhängig   | 61        |
| C.4.1    | Die Blockierung neuronaler Aktivität bewirkt ein normales Auswachsen aus PRG-1 defizienten Explanaten         | 61        |
| C.4.2    | Explanate aus LPA <sub>2</sub> /PRG-1 doppelt defizienter Tiere zeigen kein eingeschränktes Auswachsverhalten | 63        |
| C.5      | Axone von PRG-1 KO und Wildtyp Mäusen unterscheiden sich nicht in ihrer Länge                                 | 64        |
| C.6      | Die Zugabe von Glutamat verlangsamt das axonale Wachstum in organotypischen Ko-Kulturen                       | 65        |
| C.7      | Analyse der dendritischen Spines <i>in vivo</i>   | 68        |
| C.7.1    | PRG-1 defiziente Dendriten weisen eine wesentlich geringere Spinedichte auf als Wildtyp Dendriten             | 72        |
| C.7.2    | Die Größe der Spines ist bei PRG-1 defizienten Tieren nicht beeinflusst                                       | 73        |
| C.8      | Die Spinedichte ist direkt abhängig vom postsynaptischen PRG-1  | 74        |
| C.9      | Eine modulierte Phosphatasesequenz in PRG-1 verhindert das Wiederherstellen des Wildtyp Phänotypus            | 76        |
| C.10     | Adulte PRG-1 KO Tiere weisen eine niedrige Spinedichte auf  | 77        |
| C.11     | PRG-1 hat Einfluss auf die Dendritenmorphologie primärer hippocampaler Neurone <i>in vitro</i>                | 78        |
| C.12     | Die Überexpression von PRG-1 führt in nicht-neuronalen Zellen zur vermehrten Bildung von Filopodien           | 82        |
| C.13     | PRG-1 hat Einfluss auf die Spinebildung in primären hippocampalen Neuronen <i>in vitro</i>                    | 82        |

---

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| C.14     | LPA <sub>2</sub> /PRG-1 doppelt defiziente Neurone zeigen keinen Effekt in der Spinedichte                    | 84         |
| <b>D</b> | <b>Diskussion</b>   | <b>85</b>  |
| D.1      | PRG-1 und auswachsende Axone  | 85         |
| D.2      | Axonales Auswachsen und neuronale Aktivität   | 86         |
| D.3      | Die PRG-1 KO Maus erfüllt die Voraussetzungen für die Theorie des geringeren Auswachsens durch mehr Input     | 88         |
| D.3.1    | PRG-1 KO besitzt eine erhöhte mEPSC Frequenz  | 88         |
| D.3.2    | Die Neurone des ECs reagieren auf Glutamat  | 90         |
| D.3.3    | Die Blockierung von Ionenkanäle stellt bei PRG-1 defizienten Kulturen den Phänotypen des Wildtypus wieder her | 90         |
| D.4      | Axonales Verzweigungsmuster ('Axon branching')  | 91         |
| D.5      | PRG-1 induziert die Bildung von Filopodien  | 92         |
| D.6      | PRG-1 scheint an der Bildung von Spines, aber nicht an der von Synapsen beteiligt zu sein                     | 92         |
| D.7      | Veränderungen in Spines nach einer Deafferenzierung   | 94         |
| D.8      | Synaptische Aktivität und Spineverlust  | 95         |
| C.9      | Fazit und Ausblick  | 96         |
| <b>E</b> | <b>Literaturverzeichnis</b>   | <b>98</b>  |
|          | <b>Danksagung</b>   | <b>105</b> |
|          | <b>Eidesstattliche Erklärung</b>  | <b>107</b> |
|          | <b>Lebenslauf</b>   | <b>108</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|                   |  |
|-------------------|--|
| 2PLSM             | 2-Photonen-Laserrastermikroskopie                        |
| AP                | Alvear Path  |
| AS                | Aminosäure   |
| BME               | Basal Medium Eagle                                       |
| CA 1 – 3          | Cornu Ammonis 1 – 3                                      |
| $[Ca^{2+}]_i$     | intrazellulärer Kalziumspiegel                           |
| CaCl <sub>2</sub> | Kalziumchlorid   |
| CaMKII            | Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-Dependent Protein Kinase II |
| CLSM              | Konfokale Laserrastermikroskopie                         |
| CNQX              | 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione                     |
| CRMP2             | Collapsin Response Mediated Protein 2                    |
| DAB               | 3,3'-Diaminobenzidin                                     |
| DAPI              | 4',6-Diamidino-2-phenylindol                             |
| DG                | Gyrus Dentatus   |
| DIV               | Days in vitro (Tage in Kultur)                           |
| DMEM              | Dulbecco's Modified Eagle Medium                         |
| DMSO              | Dimethylsulfoxid   |
| E                 | Embryonaltag   |
| EC                | Entorhinaler Cortex (Kortex)                             |
| EDTA              | Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat      |
| EGFP              | Enhanced GFP   |
| Eph               | Ephrine  |
| EPSC              | Excitatory postsynaptic current                          |
| ER                | Endoplasmatisches Retikulum                              |
| FCS               | Fetal calf Serum (fetales Kälberserum)                   |
| GAP               | GTPase-aktivierendes Protein                             |
| GEF               | Guanin Nukleotid Austauschfaktor                         |
| GFP               | Grün fluoreszierendes Protein                            |
| GPI               | Glycosylphosphatidylinositol                             |
| h                 | Stunde   |
| HBSS              | Hank's buffered salt solution                            |
| iml               | Innere Molekularschicht (inner molecular layer)          |
| IP <sub>3</sub>   | Inositol-1,4,5-Triphosphat                               |
| KCl               | Kaliumchlorid  |
| KO                | Knock-Out  |

---

|           |   |
|-----------|---|
| slm       | Stratum lacunosum moleculare                    |
| LPA       | Lysophosphatidsäure                             |
| LPP       | Lipid Phosphat Phosphatase                      |
| LPR       | Lipid Phosphatase-related Protein               |
| MAG       | Monoacylglycerol                                |
| MAP2      | Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2              |
| MEM       | Minimal Essential Medium                        |
| NA        | Numerische Apertur                              |
| NaCl      | Natriumchlorid                                  |
| NaOH      | Natriumhydroxid                                 |
| NDET      | Number of dendritic end tips                    |
| NGS       | Normal goat serum (Ziegenserum)                 |
| NHS       | Normal horse serum (Pferdeserum)                |
| oml       | Äußere Molekularschicht (outer molecular layer) |
| P         | Postnataler Tag                                 |
| PB        | Phosphatpuffer                                  |
| PBS       | Phosphatgepufferte Salzlösung                   |
| PCR       | Polymerase chain reaction                       |
| PDK       | 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1   |
| Pen/Strep | Penicillin und Streptomycin                     |
| PFA       | Paraformaldehyd                                 |
| PI        | Propidiumiodid                                  |
| PI3K      | Phosphatidylinositol-3-Kinase                   |
| PLL       | Poly-L-Lysin                                    |
| PNS       | Peripheres Nervensystem                         |
| PP        | Perforant Path                                  |
| PRG       | Plasticity related gene                         |
| PSD95     | Post synaptic density 95                        |
| RT        | Raumtemperatur                                  |
| RTK       | Rezeptor Tyrosin Kinasen                        |
| SDS       | Natriumdodecylsulfat                            |
| SEM       | Standardfehler                                  |
| sm        | Stratum moleculare                              |
| so        | Stratum oriens                                  |
| sp        | Stratum pyramidale                              |
| sr        | Stratum radiatum                                |
| SUB       | Subiculum                                       |

|          |                                |
|----------|--------------------------------|
| TBE      | Trisbase-Borsäure-EDTA         |
| Trisbase | Tris[hydroxymethyl]aminomethan |
| TTX      | Tetrodotoxin                   |
| UpM      | Umdrehungen pro Minute         |
| WT       | Wildtyp                        |
| ZNS      | Zentrales Nervensystem         |

## Zusammenfassung

Während der Entwicklung des Netzwerkes im zentralen Nervensystem legen die Axone der Neurone große Entfernungen zurück, um an ihre Zielzellen zu gelangen, mit denen sie synaptische Verbindungen eingehen. Das axonale Auswachsen wird von spezifischen Molekülen geleitet, die Richtung und Mobilität des terminalen Wachstumskegels, dem Growth Cone, vorgeben.

Plasticity related gene-1 (PRG-1) wurde 2003 als potentiell Molekül entdeckt, dass an der Regulation des axonalen Auswachsens im Hippokampus beteiligt ist. Die Expression beginnt mit dem Embryonaltag 19, einem Zeitpunkt, an dem die Fasertrakte des Hippokampus ausgebildet werden. Außerdem wurde gezeigt, dass das Niveau der mRNA-Transkripte nach einer Kortexläsion hochreguliert wird. In dieser Arbeit wurde die Rolle von PRG-1 an dem axonalen Auswachsen näher untersucht. Dazu wurde mit einer konditionellen PRG-1 KO Maus gearbeitet, die es ermöglichte, den Effekt der Defizienz zu analysieren. Für die *in vitro* Experimente wurde ein entorhinal-hippokampales Ko-Kultur-Modell verwendet, indem grün-fluoreszierende Fasern in einem nicht-fluoreszierenden Hippokampus leicht zu detektieren waren. EGFP-exprimierende Mäuse wurden mit der PRG-1 KO Maus gekreuzt und die Ko-Kulturen wurden für 2 verschiedene Experimente verwendet. Die Intensitätsmessungen des Fasertraktes ergaben eine deutlich geringere Innervierung des Hippokampus bei PRG-1 defizienten Axonen und Lebendmessungen (eng: life-imaging) zeigten eine reduzierte Wachstumsgeschwindigkeit solcher Axone. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass PRG-1 nicht, wie ursprünglich vermutet, auf auswachsenden Axonen lokalisiert ist. Dieser Befund und die Tatsache, dass PRG-1 defiziente Tiere eine Erhöhung der mEPSC Frequenz aufweisen, lässt vermuten, dass der Effekt aktivitätsabhängig sein müsste. Weitere Experimente mit einem organotypischen Kultur-Modell, indem durch die Inhibierung der neuronalen Aktivität der Effekt des geringeren Auswachsens der Axone aufgehoben werden konnte, bestätigten diese Theorie.

Dendritenbäume und besonders Spines gelten als Orte der synaptischen Transmission und deren korrekte Entwicklung ist essentiell für die neuronale Informationsweiterleitung. Abnormale Dendritenstrukturen und Veränderungen in der Spinemorphologie werden häufig bei Patienten mit kognitiven Beeinträchtigungen gefunden.

Die Expression von PRG-1 erreicht ihren Höhepunkt in der zweiten Lebenswoche. Das ist in der Entwicklung des Gehirns der Zeitpunkt, an dem die Spines gebildet werden (Spinogenese). Außerdem ist das Molekül in der postsynaptischen Dichte glutamaterger Neurone lokalisiert. Diese Tatsachen sprechen für eine Beteiligung von PRG-1 an der Spines- und auch Dendritenbildung, was in dieser Arbeit näher untersucht wurde. Analysen

einer EGFP-exprimierenden PRG-1 KO Maus ergaben im Vergleich mit dem Wildtyp für unterschiedliche Alterstufen eine signifikant reduzierte Spindichte im Hippokampus. Dieser Effekt konnte durch *in utero* und *in vitro* Experimente auch auf Einzelzellebene bestätigt werden. Analysen von primären hippocampalen Neuronen ergaben auch eine Reduzierung der Dendritenkomplexität in PRG-1 defizienten Zellen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von PRG-1 in PRG-1 KO Tieren den Effekt der PRG-1 Defizienz aufhebt und in neuronalen und nicht-neuronalen Zellen die Bildung von Spines und Filopodien, den Vorläufern von Spines, induziert.

## Summary

In the central nervous system, in course of network formation, neurons project axons over long distances to target cells, where they form Synapses. Axon outgrowth is conducted by specific guiding cues which determine the direction and the motility of the terminal end tip, the growth cone.

Plasticity related gene-1 (PRG-1) was found in 2003 as prospective new molecule facilitating axonal outgrowth. Expression starts at embryonic day 19 (E19), the timepoint, where fibertracts in hippocampus are formed. Furthermore, it could be shown that expression is upregulated after a cortex lesion. In order to elucidate the specific role of PRG-1 on the process of axonal outgrowth, a conditional PRG-1 KO mouse was used in this study. Using a co-culture model of organotypic brain slices, which combines a non-fluorescent hippocampus with an EGFP expressing entorhinal cortex, made it possible to detect outgrowing fibers. EGFP-expressing mice were bred with the PRG-1 KO mouse and prepared co-cultures were used for two different experiments. Intensity measurements of the fibertract showed significant reduced innervation of the hippocampus if PRG-1 is missing in the outgrowing axons and life-imaging experiments exhibit a decreasing outgrowing rate. As it could be shown in this study that PRG-1 is not located on axons as assumed originally and the fact that PRG-1 deficient animals exhibit an increase in mEPSC frequency, it was assumed that the observed effect might be dependant of neuronal activity. This theory was supported by the fact that in a second organotypic culture-system, the effect of decreased outgrowth was inhibited by blockade of calcium channels.

As principal sites of excitatory synaptic input, spines and dendritic arbors play a key role in the connectivity of the brain. Their correct development is essential for neuronal information processing, and abnormal dendritic structures and alterations in spine morphology are widespread in neurons of patients with cognitive impairments.

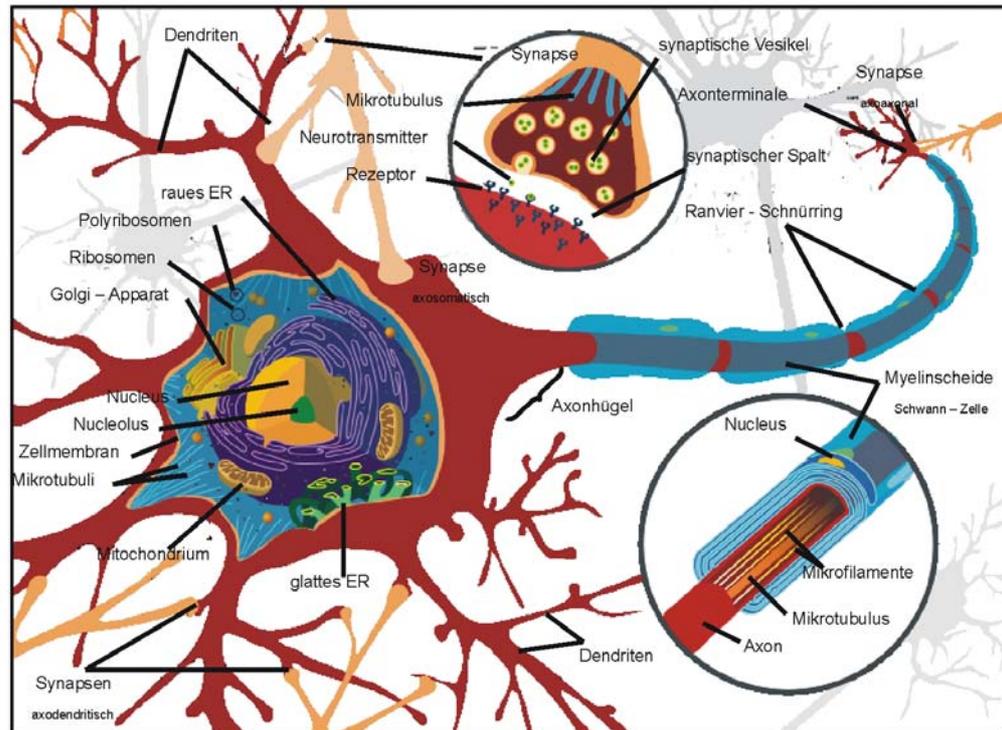
As the expression of PRG-1 peaks during the third postnatal week, the time of spineformation and the fact, that PRG-1 is located on postsynaptic density (PSD) of glutamatergic neurons, it was assumed that PRG-1 plays a critical role in the development of dendrites and spines. In this study, the analysis of an EGFP-expressing PRG-1 KO mouse revealed a significant decreased spine density at different timepoints in comparison with the WT. This observation could be confirmed by *in utero* and *in vitro* experiment on single cell level. In addition, analysis of primary hippocampal neurons revealed a reduction of dendritic tree complexity. Furthermore, the overexpression of PRG-1 rescue the effect of PRG-1 deficiency in conditional KO mice and induced the formation of spines and filopodia, the precursor of dendritic spines, in neuronal and non-neuronal cells.

# **A Einleitung**

## **A.1 Das Nervensystem**

Der Begriff Nervensystem bezeichnet die Gesamtheit aller Nervenzellen in einem Organismus und beschreibt, wie diese angeordnet und miteinander verbunden sind. Bei höheren Tieren hat dieses Organsystem die Aufgabe, Informationen aus der Umwelt in Form von peripheren Sinnesreizen aufzunehmen und diese über Nervenfasern dem zentralen Nervensystem (ZNS) zuzuleiten. Die Hintereinanderschaltung von Nervenzellen erlaubt die Verarbeitung solcher afferenten Impulse und die Weiterleitung über efferente Fasern vom ZNS an ein Erfolgsorgan.

Eine Nervenzelle oder ein Neuron ist eine auf Reizaufnahme, Erregungsleitung und Reizverarbeitung spezialisierte Zelle. Sie besteht aus einem Zellkörper (Perikaryon oder Soma), der den Zellkern und die zytoplasmatischen Organellen enthält. Ausdifferenzierte Neurone besitzen keine Zentriolen, d.h. diese Zellen haben ihre Teilungsfähigkeit verloren. Der Untergang von Neuronen z. B. durch einen Unfall oder durch eine Krankheit, ist durch eine erneute Zellteilung nicht ausgleichbar. Von dem Zellkörper gehen erregungsleitende Fortsätze in unterschiedlicher Zahl und Form ab: zahlreiche kurze, stark verästelte Dendriten, die dem Erregungsempfang dienen und einem einzigen langen Axon, das die Erregung an andere Nervenzellen oder Erfolgsorgane, z. B. Muskeln, weiterleitet. Die Verbindung zwischen den einzelnen Fortsätzen verschiedener Zellen wird durch Synapsen aufgebaut. Sie dienen der direkten Erregungsweiterleitung von einer Zelle zur nächsten. Eine schematische Darstellung einer Nervenzelle ist in Abbildung 1 gezeigt.



**Abbildung 1:** **Schematische Darstellung einer Nervenzelle.** Die stark verästelten Dendriten dienen dem Erregungsempfang, das mit einer Myelinscheide ummantelte Axon dient der Erregungsweiterleitung. Die Verbindungen zwischen den Fortsätzen und somit zwischen den Neuronen im zentralen Nervensystem (ZNS) werden von Synapsen gebildet. ([http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d6/Complete\\_neuron\\_cell\\_diagram\\_de.svg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d6/Complete_neuron_cell_diagram_de.svg))

## A.2 Polarisierung

Hippokampale Neurone in Kultur haben sich als gutes Modellsystem zur Beobachtung der neuronalen Differenzierung erwiesen (Bray, 1973; Bray und Chapman, 1985). Dotti et al. (1988) unterteilen die gesamte Entwicklung in fünf Stadien, die in Abbildung 2 gezeigt sind:

Stadium 1: Bildung von Lamellipodien. Kurz nach der Anheftung der Zellen an ein geeignetes Substrat (nach 1 – 2 Stunden) bilden sie um die Zellkörper herum flache, motile Lamellipodien, die von Minute zu Minute ihre Form verändern. Diese Strukturen weisen v. a. Aktinfilamente auf und nur wenige, unorientierte Mikrotubuli.

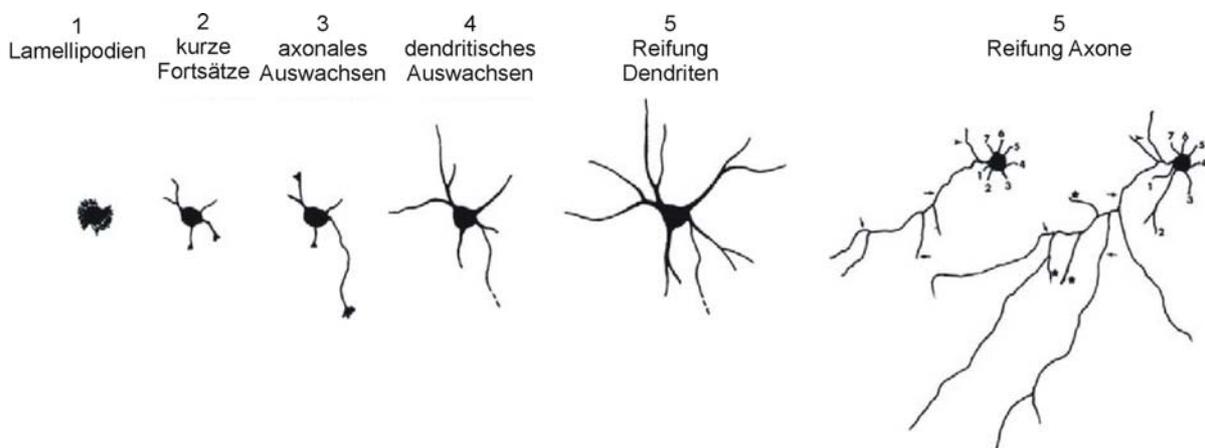
Stadium 2: Auswachsen kurzer Fortsätze. Die Lamellipodien werden zu kurzen Neuriten umgewandelt mit Mikrotubuli, die parallel zur Längsachse angeordnet sind. Diese Strukturen sind über mehrere Tage stabil, wobei sie ständigen Verlängerungen und Retraktionen unterliegen. Sie weisen Wachstumskegel an ihren Enden auf. In diesem Stadium ist die Zelle noch unpolarisiert.

Stadium 3: Bildung und Wachstum des Axons. Einige Stunden nach Erscheinen der kurzen Neuriten beginnt einer dieser Fortsätze mit einer erhöhten Geschwindigkeit auszuwachsen.

Das entstandene Axon bildet viele kleine Verästelungen auf seiner ganzen Länge und einen großen 'Wachstumskegel' aus. Dieses Stadium ist nach ungefähr 2 Tagen erreicht und die Zelle ist zu diesem Zeitpunkt polarisiert.

Stadium 4: Dendritenwachstum. Zwei bis drei Tage nach Bildung des Axons beginnen die restlichen Fortsätze auszuwachsen und sich zu Dendriten zu differenzieren. Die Wachstumsgeschwindigkeit ist um das 5-fache geringer als beim Axon.

Stadium 5: Kontinuierliche Reifung von Axon und Dendriten. Axon und Dendriten bilden weite Verzweigungen aus. Auf den Dendriten entstehen Dornen (engl.: Spines) und Synapsen werden gebildet (Dotti et al., 1988).



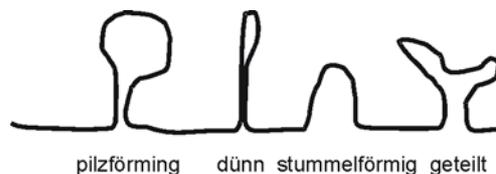
**Abbildung 2:** *Entwicklung von Neuronen in Zellkultur.* Stadium 1 ist geprägt von motilen Lamellipodien um den Zellkörper herum, die in Stadium 2 zu stabileren Neuriten umgewandelt werden. In Stadium 3 bildet sich das Axon heraus und ist nach 2 Tagen in Kultur schon verzweigt. Die Bildung von Dendriten erfolgt in Stadium 4. In Stadium 5 reifen die Neurone heran. Zeichnung nach Dotti et al., 1988.

### A.3 Dendriten und Spines

Bei voranschreitender Entwicklung der Nervenzellen beginnt die Verzweigung der Dendriten. Es wird angenommen, dass ein neuer Dendritenzweig aus einem bereits existierenden Dendritenschaft seitlich hervorgeht (Dailey und Smith, 1996; Scott und Luo, 2001). Jeder Dendritenzweig erscheint zunächst in Form eines einzelnen Filopodiums, das reich an F-Aktin-Bündeln ist. Während die meisten dieser Filopodien retrahieren, bilden einige Wachstumskegel-ähnliche Formen und entwickeln sich zu stabilen Strukturen (Dailey und Smith, 1996). Auf diese Weise führt eine Kombination aus Wachstum und Retraktion zu einer Verzweigung der einzelnen Dendriten. Dies führt zur Ausbildung eines weit verzweigten Dendritenbaumes (Cline, 2001; Wong und Ghosh, 2002). Die Dendritenstruktur

bestimmt das räumliche Ausmaß und die Art der Signaleingänge. Die Kommunikation der Zellen wird schließlich durch die Ausbildung von Synapsen erreicht.

Kleine Ausstülpungen auf den Dendriten, die man dendritische Spines nennt, repräsentieren die postsynaptische Seite einer Synapse (Harris, 1999; Hering und Sheng, 2001). Die meisten exzitatorischen Synapsen werden zwischen einem Axon und diesen dendritischen Spines gebildet. Spines können eine Vielzahl von Formen annehmen. Abbildung 3 zeigt die am häufigsten vorkommenden Formen, wobei zu bemerken ist, dass Spines dynamische Strukturen sind und ihre Form während ihrer Lebensdauer ändern.



**Abbildung 3:** *Schematische Darstellung der vier geläufigsten Spinemorphologien. Im Gehirn sind am häufigsten pilzförmige Spines zu finden, mit einem großen Köpfchen und einem langen Stiel. Daneben gibt es noch lange, dünne filopodienartige Spines, mit einem kleinen Köpfchen und auch stummelförmige Spines, als Ausstülpungen der Dendritenmembran ganz ohne Stiel. Geteilte Spines haben zwei Köpfchen, die auf einem gemeinsamen Stiel sitzen. Die Größe der Spines korreliert mit der Größe der Synapse. Modifiziert nach von Bohlen und Halbach (2009).*

Das Spineköpfchen enthält die postsynaptische Dichte (PSD), die der aktiven Zone der präsynaptischen Seite direkt gegenüber liegt (Scannevin und Hugarir, 2000; Li und Sheng, 2003). Sie besteht aus dicht gepackten Ionenkanälen und Oberflächenrezeptoren. Die Ionenkanäle der PSD wandeln das chemische Signal der Neurotransmitter, die von der Präsynapse ausgeschüttet werden, in transmembrane Ionenflüsse um. Es kommt zur Bildung von elektrischen Signalen und zur Initiierung von Signalwegen, die Regulatorproteine steuern. Eine Vielzahl von solchen Proteinen sind Aktin-bindend und regulieren das Zusammenlagern (z. B. Profilin; Lanier et al., 1999), die Stabilität und den Abbau (z.B. Gelsolin und ADF/Cofilin; Meberg et al., 1998) von Aktinfilamenten, was für die Morphologie und Motilität von dendritischen Spines von entscheidender Bedeutung ist (Ethell und Pasquale, 2005). Aktinfilamente sind der Hauptbestandteil des Zytoskeletts im Spineköpfchen, wohingegen Mikrotubuli nur im Stiel zu finden sind (Bernhardt und Matus, 1984; Kaech et al., 1997). Moleküle wie Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (MAP2), Tau und Collapsin Response Mediated Protein 2 (CRMP2) binden an Tubulin und stabilisieren so die polymerisierten Mikrotubuli (Biernat et al., 2002; Fukata et al., 2002; Harada et al., 2002). Mikrotubuli können dahingehend stimuliert werden, dass sie in die periphere Region des Wachstumskegels vordringen und dort polymerisieren (Kabir et al., 2001) und spielen somit

vor allem für das axonale Auswachsen eine wichtige Rolle. Die Destabilisierung von Mikrotubuli ist notwendig für das Einfügen von neuer Membran in den Wachstumskegel (Zakharenko und Popov, 1998). Motorproteine wie Dynein sind ebenfalls notwendig für das axonale Auswachsen, da sie aktiv Mikrotubuli entlang des Axons bis zum Wachstumskegel transportieren (Ahmad et al., 1998). Ein wichtiger Weg zur Regulierung des Zytoskeletts führt über die Rho-GTPasen, ein anderer über die Veränderung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). Beide Wege werden im Abschnitt A.6 näher erläutert, da sie auch für das axonale Auswachsen eine wichtige Rolle spielen.

#### **A.4 Das Axon**

Ein Axon kann je nach Typ der Nervenzelle 1  $\mu\text{m}$  bis 1 m und länger sein und bei Säugetieren etwa eine Dicke von 0,5 bis 10  $\mu\text{m}$  aufweisen. Das Axon ist von mehreren aufeinander folgenden Myelinscheiden, auch Schwann'sche Scheiden (Oligodendrozyten im ZNS, Schwann'sche Zellen im peripheren Nervensystem (PNS)) umhüllt. Diese lipidreiche Schicht hat in Abständen sogenannte Ranvier'sche Schnürringe, wodurch die Erregungsleitung enorm beschleunigt wird, da die Nervenimpulse von Schnürring zu Schnürring springen (saltatorische Erregungsleitung).

Die Enden von auswachsenden Axonen zeigen normalerweise hochentwickelte Wachstumskegel mit einer Vielzahl von Filopodien (Geraldo und Gordon-Weeks, 2009). Diese Struktur ist auf die Verlängerung und Steuerung des Axons spezialisiert (Mitchison und Kirschner, 1988). Neuronale Wachstumskegel sind in zwei Bereiche geteilt, die sich durch die Filamente ihres Zytoskeletts unterscheiden: eine zentrale Domäne mit Mikrotubuli und eine aktinreiche periphere Domäne. Aktin Monomere schließen sich zusammen, was zur Verlängerung der Filamente an den distalen Enden der Filopodien und Lamellipodien führt und so die Membran des Wachstumskegels nach vorne schiebt. Gleichzeitig wird das Aktin Filament durch einen Myosin-ähnlichen molekularen Motor in die zentrale Domäne zurückgezogen, in der es wieder depolymerisiert (Forscher und Smith, 1988; Tanaka und Sabry, 1995; Mitchison und Cramer, 1996). Am Ende dieser Aktin Filamente blockiert der Myosin-vermittelte retrograde Fluss das Einwandern der Mikrotubuli in die periphere Domäne, blockiert so auch das Vorankommen der peripheren Domäne und somit auch das Axon selber (Forscher und Smith, 1988). Das Gleichgewicht von anterograder Polymerisierung und retrograder Retraktion bestimmt das Vorwärtstreten der aktinreichen Struktur in der peripheren Region (Lin et al., 1996; Goldberg, 2003).

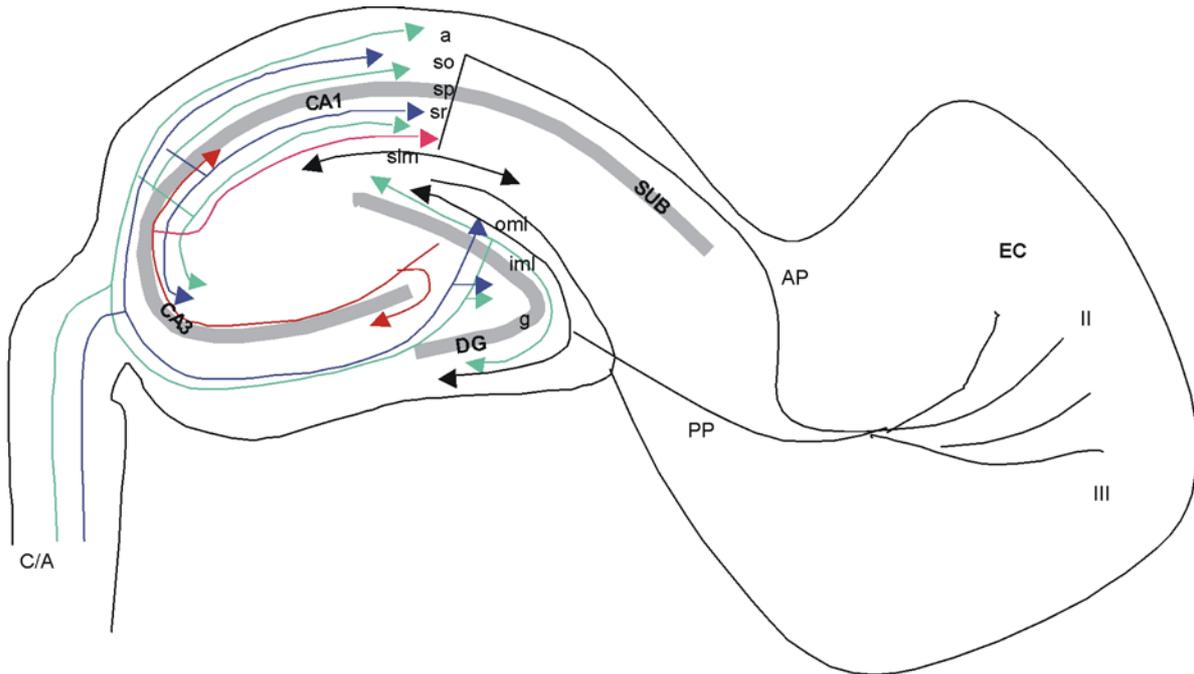
## A.5 Netzwerkbildung und axonales Auswachsen im Hippokampus

Ein zentrales Problem innerhalb der Neurowissenschaften betrifft die Aufklärung der molekularen Interaktionen, die an der Bildung und Neuformation von komplexen neuronalen Netzwerken beteiligt sind. Ein entscheidender Punkt in der Entstehung von neuronalen Verbindungen ist das Auswachsen und die Wegfindung von sich entwickelnden Axonen in Richtung ihrer Zielregion (Skutella und Nitsch, 2001). Die Ausbildung von Axonen schließt die Verlängerung ihrer distalen Enden und die Bildung von neuen Fortsätzen durch Verzweigung ein (Portera-Cailliau et al., 2005). Wachstumskegel scheinen durch berührungsvermittelte oder chemische Interaktionen entscheidend für die Wegfindung zu sein (Luo, 2002).

In den letzten Jahren wurde deutlich, dass spezielle Moleküle für die Spezifität der Verbindungen im Gehirn verantwortlich sind. Axone innervieren spezielle Hirnregionen und bilden dort Synapsen aus, meiden aber andere. Die lokale Expression von anziehenden und abstoßenden Leitmolekülen und die Anwesenheit ihrer Rezeptoren an axonalen Wachstumskegeln scheint eine entscheidende Rolle in der schichtenartigen Entwicklung des Gehirns zu spielen (Skutella und Nitsch, 2001).

Der Hippokampus zeigt eine simple und übersichtliche Anordnung dieser Schichtenspezifität. Das hat dazu geführt, dass organotypische hippocampal-entorhinale Hirnschnittkulturen als geeignetes *in vitro* Modell benutzt werden, um dem Prozess des axonalen Auswachsens näher auf den Grund zu gehen. Dieses Modell eignet sich hervorragend zur Untersuchung von neuronaler Differenzierung, axonalem Auswachsen und der spezifischen Wegfindung von Axonen (Skutella und Nitsch, 2001; Hechler et al., 2006).

Die Hippokampus-Formation setzt sich aus folgenden Regionen zusammen: Gyrus dentatus (DG), Hippokampus proper oder Cornu ammonis (unterteilt in die Felder CA3, CA2, CA1), Subikulum, Präsubikulum, Parasubikulum und entorhinaler Kortex (EC), wobei der DG, CA1 – 3 und das Subikulum zum dreischichtig aufgebauten Allokortex gehören. Im Gegensatz dazu ist der EC aus 6 Schichten (I – VI) aufgebaut. Die wichtigsten afferenten Fasern des Hippokampus sind die Projektionen aus dem EC, die Assoziationsfasern, die Fasern aus dem exzitatorischen kommissuralen System und die septalen Projektionen (Burwell et al., 1995). Wie Abbildung 4 zeigt, enden diese Fasern alle schichtenspezifisch an ihren Zielneuronen im Gyrus Dentatus (DG) und in der Cornu ammonis (CA). Innerhalb des Hippokampus verbinden die Moosfasern (Axone der Körnerzellen des DG) den DG mit CA3 und die Schaffer Kollaterale verbinden CA3 mit CA1.



**Abbildung 4:** Die wichtigsten Fasertrakte des Hippokampus. Der Perforant Path (PP) und der Alvear Path (AP) sind in schwarz dargestellt. Es sind Projektionen des Entorhinalen Kortex (EC) und kommen von Zellen, die in den Schichten II und III des ECs lokalisiert sind. Sie enden in der äußeren molekularen Schicht (omI) des Gyrus Dentatus (DG) bzw. im Stratum lacunosum moleculare (sIm) der Cornu ammonis (CA). Die commissuralen/assoziationalen Projektionen (C/A) sind in grün gezeigt. Sie stammen von kontralateralen Mooszellen und enden in der inneren Molekularschicht (imI) des DG und dem stratum radiatum (sr) der CA. Diese Fasern und der PP formen eine scharfe Grenze innerhalb der Molekularschicht. Die septalen Fasern sind in blau dargestellt und kommen vom medialen septum. Sie enden unterhalb der Körnerzellschicht (g) und in beiden Molekularschichten des DG, wie auch im stratum radiatum und stratum oriens (so) der CA. Die Moosfasern sind in rot eingezeichnet, die Schaffer Kollaterale in pink (Erläuterung s. Text). a: Alveus; sp: Stratum pyramidale; SUB: Subiculum. Zeichnung nach Skutella und Nitsch (2001).

Es stellt sich nun die Frage, welche Moleküle während der Gehirnentwicklung für das axonale Auswachsen und die Bildung der korrekten Verknüpfungen in der richtigen Schicht eine Rolle spielen. Solche Leitmoleküle könnten an den Dendriten der Zielzellen lokalisiert sein, an den Axonen selber, an Gliazellen und anderen extrazellulären Matrixkomponenten, oder auch an sogenannten Pioneer-Neuronen (z.B. Cajal-Retzius Zellen) (Skutella und Nitsch, 2001). Die Rezeptoren der extrazellulären Leitmoleküle befinden sich auf der Oberfläche der Wachstumskegel und durch Bindung der Liganden werden intrazelluläre Signalkaskaden initiiert, die zu einer Modulation des Aktin Zytoskeletts im Wachstumskegel führen. Das kann zum einen eine Vorwärtsbewegung des Axons, zum anderen ein Ausharren oder aber ein Zurückziehen bis hin zu einem Kollaps des Wachstumskegels bedeuten (Nakamura et al., 2000).

Im Laufe der letzten Jahre wurden einige dieser extrazellulären Moleküle identifiziert. Sie haben entweder anziehende oder abstoßende Wirkung auf auswachsende Axone, oder auch beides, abhängig von unterschiedlichen Bedingungen. Es existieren membrangebundene oder Matrix-assoziierte Moleküle, die entweder auf kurzen Distanzen oder durch Diffusion auch auf lange Entfernungen wirken (Nakamura et al., 2000). Im folgenden Kapitel werden einige dieser Moleküle vorgestellt.

### **A.5.1 Leitmoleküle**

Zu den bekanntesten Leitmolekülen zählen Semaphorine, Netrine, das Slit-Robo System und die Ephrin Familie der Tyrosin Kinasen und deren Liganden (Colamarino und Tessier-Lavigne, 1995; Kobayashi et al., 1997; Stein et al., 1999; Steup et al., 1999; Steup et al., 2000; Skutella und Nitsch, 2001; Stein und Tessier-Lavigne, 2001; Forster et al., 2006).

Unter den Semaphorinen sind die der Klasse 3 (Vertebraten) am besten charakterisiert worden. Sie werden eingeteilt in Sema3A-Sema3F. Als Rezeptoren stehen diesen Semaphorinen Neuropilin1 (bindet Sema3A – Sema3F), Neuropilin2 (bindet Sema3B, 3C und 3F) und Plexin gegenüber (Chen et al., 1997; He und Tessier-Lavigne, 1997; Kolodkin et al., 1997). Die Semaphorine der Klasse 3 spielen als abweisende Lenkmoleküle eine Rolle bei der hippokampalen Entwicklung. Sema3A ist involviert in der Wegfindung von entorhinalen Fasern und Moosfasern, Sema3C bei der Orientierung von septalen Fasern und Sema3F in der Bildung von Verbindungen innerhalb des Hippokampus (Chedotal et al., 1998; Steup et al., 1999; Steup et al., 2000).

In bilateralen symmetrischen Lebewesen ist einer der ersten Schritte in der Entwicklung des Nervensystems die Ausbildung von kommissuralen Projektionen, die beide Körperhälften miteinander verbinden. Gruppen von spezialisierten Zellen innerhalb der Mittellinie sind essentiell für die Organisation und Leitung dieser Kommissuren (Colamarino und Tessier-Lavigne, 1995). Netrin-1 ist ein mit Laminin verwandtes, lösliches Molekül, das zwischen Embryonaltag 19 (E19) und postnatalen Tag 8 (P8) von Gliazellen und Neuronen entlang der ventralen Mittellinie exprimiert wird (Mueller, 1999). Netrine sind bifunktionale Leitmoleküle, die Axone anziehen oder abweisen können, je nach zellulären Kontext und inneren Zustand des Wachstumskegels (Ming et al., 1997; Round und Stein, 2007). Dabei ist die Zusammensetzung der Rezeptoren für Netrin-1 an der Zelloberfläche der Wachstumskegel ein entscheidender Faktor.

Robo1 und 2, transmembrane Glycoproteine der Immunglobulin Superfamilie, sind auf hohem Niveau in Wachstumskegels und weniger in den Axonen selber zu finden. In den Wachstumskegeln von Kommissuren wird Robo erst exprimiert, nachdem sie die Mittellinie

gekreuzt haben, was ein Zurückwandern der Fasern verhindert. Axone, die die Mittellinie nicht überqueren, exprimieren Robo von Beginn ihrer Entwicklung an. Es scheint also, dass Robo als Rezeptor für einen abstoßenden Liganden innerhalb der Mittellinie fungiert (Kidd et al., 1998b; Kidd et al., 1998a). Innerhalb der Hippokampus-Formation werden Robo1 und 2 im Hippokampus selber exprimiert. Deren Liganden, Slit1 und 2, werden im entorhinalen Kortex exprimiert. Slit2 ist in der Lage, hippokampale Axone abzustößen und einen Kollaps des Wachstumskegels zu induzieren. Axone des ECs exprimieren Slit2 und hindern anscheinend die Moosfasern so daran, in die dendritische Region der Körnerzellen einzuwachsen, die ihrerseits Robo exprimieren (Nguyen Ba-Charvet et al., 1999).

Ephrine (Eph) sind die größte Familie der Rezeptor Tyrosin Kinasen (RTK). Die Eph Rezeptoren EphA3 – A7 und deren Liganden Ephrin A1 – A5 werden während der Entwicklung im Hippokampus und in den afferenten und efferenten Verbindungen exprimiert (Skutella und Nitsch, 2001). EphA5 wird in der Zeit im EC exprimiert, in der auch der Perforant Path in den Hippokampus einwächst. Die mRNA des Liganden Ephrin A3 ist in der Körnerzellschicht und in der Pyramidenzellschicht zu finden. Die Bindung des Liganden konnte nicht in der äußeren, dafür aber in der inneren Molekularschicht des DG nachgewiesen werden und wirkt auf Neuriten abstoßend (Stein et al., 1999). Diese Beobachtung könnte eine Erklärung für die scharfe Grenze zwischen innerer und äußerer Molekularschicht sein.

### **A.5.2 Lysophosphatsäure**

Lysophosphatsäure (LPA, 1-Acyl-Glycerol-3-Phosphat) ist eines der einfachsten Lipid Phosphate, das ein natürlicher Bestandteil von Zellmembranen ist und auch ein intra- und extrazelluläres Signalmolekül darstellt. Die LPA spezifischen Rezeptoren vermitteln die Vielzahl der beobachteten LPA-Antworten über multiple Typen von gekoppelten heterotrimeren G-Proteinen (Gi, Gq, G12/13, Gs) und ihre aktivierenden intrazellulären sekundären Botenstoffe (Moolenaar, 1999; Anliker und Chun, 2004; Moolenaar et al., 2004). Die Aktivierung des G12/13 G-Proteins z. B. bewirkt die Aktivierung von RhoA, welches wiederum die Rho-Kinase aktiviert, die kontraktile Ereignisse wie Neuritenretraktion oder Zellabrundungen steuert (Kranenburg et al., 1999).

Lipid Phosphat Phosphatasen (LPPs) katalysieren die Dephosphorylierung von LPA zu Monoacylglycerol (MAG) und spielen daher eine wichtige Rolle bei der Synthese von Glycerolipiden und in der Phospholipid-vermittelten Signaltransduktion. Es wird angenommen, dass LPPs durch die Reduzierung der extrazellulären LPA Konzentration als

negative Regulatoren der Rezeptor gesteuerten LPA-Signaltransduktion fungieren können (Brindley, 2004; Sigal et al., 2005).

## **A.6 Intrazelluläre Signale & Aktinmobilisierung**

Durch die Bindung von extrazellulären Liganden an Rezeptoren, sei es an der Membran von Wachstumskegeln oder an der Oberfläche von Dendriten bzw. Spines, kommt es zur Modulierung des Zytoskelettes. Wie aber werden die Informationen der extrazellulären Ereignisse zum Zytoskelett transportiert? Es sind mehrerer solcher Mechanismen bekannt, von denen drei in den folgenden Kapiteln vorgestellt werden sollen.

### **A.6.1 $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration**

Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) gelangt durch den N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptor,  $\text{Ca}^{2+}$  durchlässige Subtypen von AMPA Rezeptoren und spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle in die Zelle. Zusätzlich kann  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem glatten endoplasmatischen Retikulum (ER), das als intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher fungiert, freigesetzt werden. In Spines kann das glatte ER in hohem Maße vorkommen und wird Spine Apparat genannt, wenn es auf eine bestimmte Weise in Stapel angeordnet ist. Fast 80 % der größeren pilzförmigen Spines weisen diesen Apparat auf. Kleinere Spines ohne ER scheinen die Konzentration von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auf anderer Weise zu regulieren (Spacek und Harris, 1997).

Die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem ER ist in Spines der hippokampalen Pyramidenzellen durch den Ryanodin Rezeptor und in Purkinje Zellen durch den Inositol-1,4,5-Triphosphat ( $\text{IP}_3$ ) Rezeptor geregelt (Svoboda und Mainen, 1999; Rose und Konnerth, 2001). Die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) kann gegensätzliche Effekte auf die Morphologie der Spines haben, abhängig von Umfang und Dauer der Kalziumtransiente (Segal et al., 2000). Eine geringe und vorübergehende Erhöhung führt zu einer Verlängerung der Spines, eine hohe und andauernde Erhöhung reduziert die Spinegröße bis hin zum Verschwinden (Ethell und Pasquale, 2005).

Veränderungen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  innerhalb der axonalen Wachstumskegel können eine Folge der Aktivierung der Rezeptoren in den Membranen der Wachstumskegels durch Leitmoleküle sein. Diese Veränderungen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  gelten als Schlüsselereignisse für das Navigieren und Auswachsen der Wachstumskegels (Gomez und Spitzer, 2000). Das Auswachsen

verlangsamt oder beschleunigt sich, wenn  $[Ca^{2+}]_i$  über oder unterhalb eines gewissen Spiegels steigt bzw. fällt (Kater und Mills, 1991).

Ein Beispiel für eine  $Ca^{2+}$ -abhängige Regulation ist die  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-Dependent Protein Kinase II (CaMKII), die schon durch einen geringen Anstieg von  $Ca^{2+}$  aktiviert wird. Diese Kinase aktiviert wiederum unter anderem Ras, was nicht nur die Rho-GTPasen aktivieren kann, sondern auch auf die Kinasen MEK1/2 und schließlich auf Erk1/2 wirkt. Diese wiederum regulieren Zytoskelett-Proteine und sind für die Bildung von Filopodien essentiell (Wu et al., 2001).

## A.6.2 GTPasen

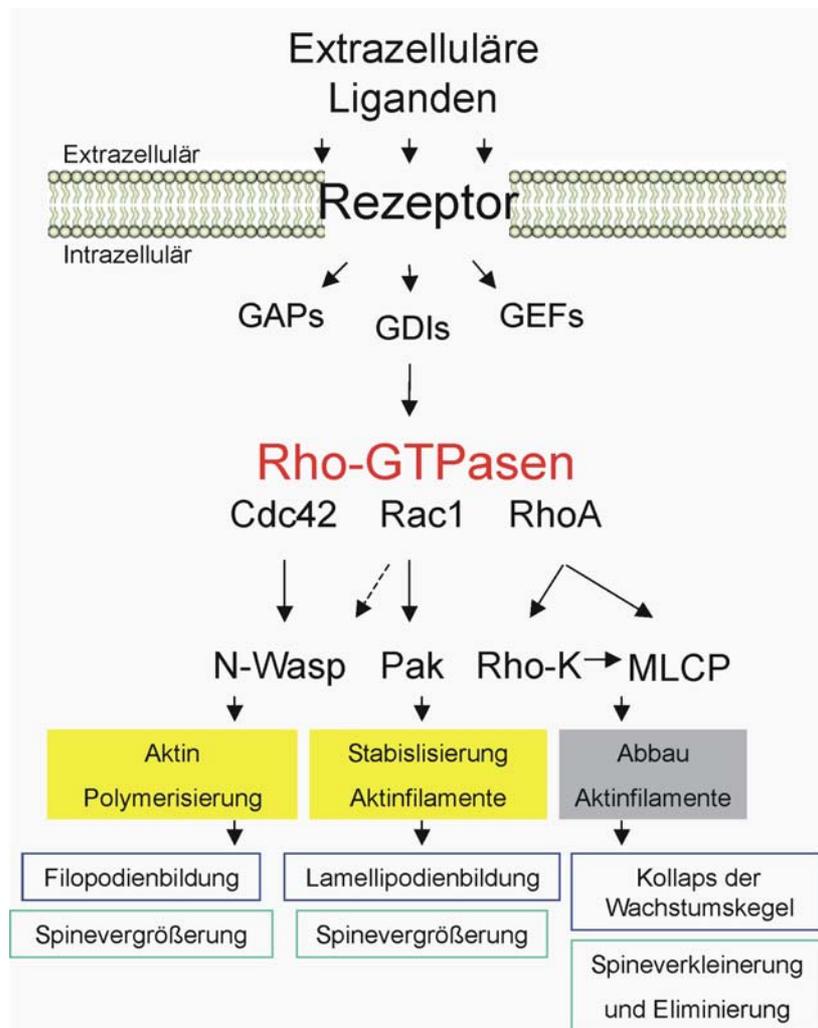
Rho-GTPasen wirken als Regulatoren des Aktin-Zytoskeletts und haben eine entscheidende Bedeutung bei der Wegfindung und dem Auswachsen von Axonen (Hall, 1994; Narumiya et al., 1997; Tapon und Hall, 1997; Van Aelst und D'Souza-Schorey, 1997) wie auch bei der Bildung von dendritischen Filopodien und Spines (Ethell und Pasquale, 2005). Eine kurze Übersicht über die Signalwege der Rho-GTPasen gibt Abbildung 5.

Rho-GTPasen ('Ras homology') gehören zur Ras-Superfamilie kleiner GTP-bindender Proteine (McCormick, 1995), wobei die Familienmitglieder RhoA (Ras homologous member A), Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) und Cdc42 (cell division cycle 42) am besten charakterisiert sind. Sie sind aktiv, wenn GTP gebunden ist und inaktiv nach der Hydrolyse von GTP zu GDP. Sie werden also von Guanin Nukleotid Austauschfaktoren (GEFs) aktiviert und von GTPase-aktivierenden Proteinen (GAPs) inaktiviert. Als weitere Regulatoren der GTPasen agieren die Guanin Nukleotid Dissoziationsinhibitoren (GDIs), die diese Proteine in ihrer inaktiven, GDP-gebundenen Form stabilisieren (Van Aelst und D'Souza-Schorey, 1997).

Im aktiven Zustand fördert RhoA den Kollaps von Wachstumskegel und die Retraktion von Neuriten, eine Inhibierung führt zu einer Steigerung des axonalen Auswachsens. Im Gegensatz dazu steigern Rac1 und Cdc42 in ihrem aktiven Zustand die Aktivität von Filopodien und Lamellipodien, die wichtig sind für die Verlängerung des Axons (Patel und Van Vactor, 2002; Goldberg, 2003).

Die Bedeutung der Rho-GTPasen für die Entwicklung und Morphologie von Spines wurde durch Überexpression bzw. Inhibierung von RhoA, Rac1 und Cdc42 entdeckt. Die Überexpression von aktivem RhoA in hippokampalen Schnittkulturen führt zur Absenkung der Spinedichte (Tashiro et al., 2000; Govek et al., 2004), die Inhibierung der RhoA Aktivität durch das C3 Transferase Exoenzym hat eine Steigerung der Dichte bzw. der

Länge der Spines zur Folge (Ethell und Pasquale, 2005). Die Expression von dominant-negativem Cdc42 inhibiert die Spinemorphogenese in dissoziierten hippocampalen Neuronen und in Neuronen des visuellen Systems von *Drosophila*, nicht jedoch in hippocampalen Schnittkulturen (Tashiro et al., 2000; Irie und Yamaguchi, 2002; Scott et al., 2003; Govek et al., 2004). In Kulturen von dissoziierten hippocampalen Neuronen führt die Überexpression von konstitutiv aktivem Rac1 zu lamellipodienartigen Ausstülpungen und die Expression eines dominant-negativen Rac1 zu einer deutlichen Erhöhung der Anzahl von Spines und Synapsen (Nakayama et al., 2000; Penzes et al., 2003; Zhang et al., 2003).



**Abbildung 5:** Auszug der intrazellulären Signalkaskaden der Rho-GTPasen. Einige Signalwegen, die für die Spinebildung und bei dem axonalen Auswachsen eine Rolle spielen. Modifiziert nach Ethell und Pasquale (2005).

### **A.6.3 PI3K/Akt-Signalweg**

Als weiterer Weg, der bedeutend für neuronales Wachstum, Überleben, Neuritenauswachsen und synaptische Plastizität beschrieben wurde, zählt der Phosphoinositol-3 Kinase (PI3K)/Akt-Signalweg (Atwal et al., 2000; Kuruvilla et al., 2000; Markus et al., 2002; Sanna et al., 2002).

Durch die Aktivierung von RTK über Mitogene oder trophische Faktoren kommt es zur Aktivierung der PI3K durch Rekrutierung von SH-Domänen (src-homology) enthaltenden Adapterproteinen und Ras. Dies führt zu einer erhöhten Produktion an Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP3). Als Konsequenz erhöht sich der PIP3-Spiegel und es werden die 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) und Akt an die Zellmembran rekrutiert, wo Akt durch die PDK1 phosphoryliert wird. Das aktivierte Akt hat Einfluss auf verschiedene Abläufe in der Zelle und im Zellkern (Cell Signaling Technology).

## **A.7 Plasticity Related Gene-1**

Die bis hierhin vorgestellten Moleküle, die beim axonalen Auswachsen und der Spinebildung von Bedeutung sind, sind nur ein Ausschnitt der schon bekannten Faktoren und die Ermittlung von wichtigen molekularen Mechanismen für die Gehirnentwicklung ist noch lange nicht abgeschlossen.

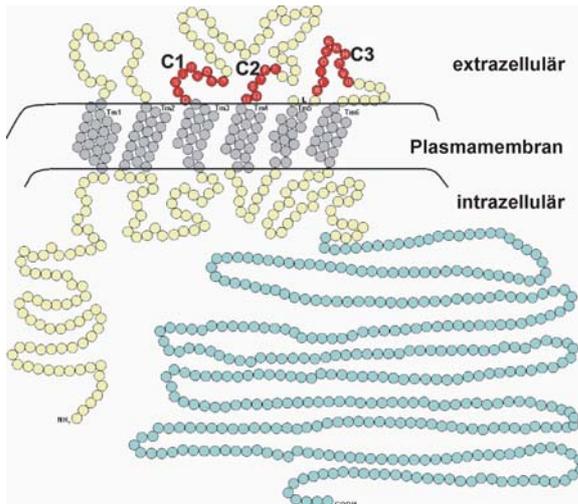
So wurde 2003 von Bräuer et al. bei der Suche nach Genen, die während des axonalen Wachstums und des regenerativen Sproutings nach Läsion hochreguliert werden, ein neues Mitglied der LPPs entdeckt. Es wurde angenommen, dass dieses Gen eine wichtige Rolle bei den plastischen Umbauprozessen nach einer Schädigung und während der Entwicklung im Gehirn spielt und wurde daraufhin Plasticity Related Gene-1 (PRG-1) genannt (NCBI Zugriffsschlüssel: AF541279). Im Rahmen dieser Arbeit wird PRG-1 auf seine Funktion während des axonalen Wachstums und Spineogenese untersucht und im folgenden Kapitel ausführlicher vorgestellt.

### **A.7.1 Struktur und Eingruppierung von PRG-1**

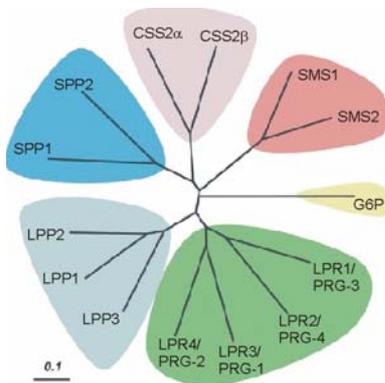
Das 764 Aminosäuren (AS) große PRG-1 besitzt am Amino (N)-Terminus 6 Transmembrandomänen mit hochkonservierten Phosphatasedomänen, die sehr ähnlich sind zu anderen Mitglieder der LPP Familie (Abbildung 6C). Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern dieser Familie besitzt PRG-1 am Carboxy (C)-Terminus einen 400 Aminosäure

langen hydrophilen Bereich, der auf der zytoplasmatischen Seite liegt (Abbildung 6A) (Brauer et al., 2003). Durch *in silico* Sequenzanalysen konnten bis jetzt 4 weitere Proteine (PRG-2 – 5) gefunden werden, die hohe Homologien zu PRG-1 aufweisen (Abbildung 6B), wobei von diesen nur PRG-2 ebenfalls einen langen hydrophilen C-Terminus besitzt (Brauer et al., 2003; Brauer und Nitsch, 2008).

**A**



**B**



**C**

|       | C1                               | C2                               | C3   |
|-------|----------------------------------|----------------------------------|--|
| LPP-1 | (125)K <u>Y</u> SIGRL <u>R</u> P | (174) <u>S</u> G <u>H</u>        | (221)SRVSDYK <u>H</u> H <u>W</u> S <u>D</u>          |
| PRG-1 | (197)Q <u>L</u> STGYQ <u>A</u> P | (250) <u>S</u> <u>Q</u> <u>H</u> | (296)T <u>R</u> ITQYK <u>N</u> H <u>P</u> V <u>D</u> |

**Abbildung 6: Struktur von PRG-1 und Eingruppierung der PRG Familie. A) Strukturmodell von PRG-1.** Basierend auf der LPP Modellstruktur liegt der hydrophile C-Terminus (blau) intrazellulär, wohingegen spezifische Domänen (C1-C3), die bei den LPPs zur Interaktion mit Lipid Phosphaten führen, extrazellulär sind (rot) (Zhang et al., 2000). **B) Protein Sequenzvergleiche** zeigen deutliche Homologien der PRGs mit LPPs. Sie bilden eine neue Klasse der Lipid Phosphatase / Phosphotransferase Familie (Sigal et al., 2005). **C) Vergleich der Aminosäure (AS)-Sequenz innerhalb der Phosphatasedomänen** zwischen LPP1 und PRG1. Die für die Phosphataseaktivität essentiellen AS sind rot dargestellt. Sie sind in PRG1 nur teilweise konserviert (betroffenen AS sind unterstrichen) (Brindley und Waggoner, 1998; Zhang et al., 2000).

## A.7.2 Die Expression und mögliche Funktion von PRG-1

PRG-1, auch LPR-3 für Lipid Phosphatase-related Proteins, wird entwicklungsabhängig und besonders stark nach einer Schädigung des Gehirns spezifisch in neuronalen Zellen von Vertebraten exprimiert. Die Expression beginnt ab dem E19 vorerst nur in der hippokampalen Anlage. Mittels *in situ* Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass nach der Geburt PRG-1 auch in den Körner- und Pyramidenzellen des Hippokampus und im EC zu finden ist (Bräuer et al., 2003). Das höchste Expressionssignal wird mit P10 erreicht und ist im adulten Stadium konstant (persönliche Kommunikation, Olga Kieselmann, Charité). PRG-1 ist an der PSD von exzitatorischen Synapsen zu finden (Trimbuch et al., 2009). Bräuer et al. konnten zeigen, dass nach einer EC-Läsion PRG-1 im adulten Gehirn hochreguliert wird. Immunhistologische Färbungen zeigten PRG-1 auf den neu auswachsenden Axonen. Aufgrund der hohen Homologien zu den LPPs wurde angenommen, dass PRG-1 während des axonalen Wachstums und des regenerierenden axonalen Auswachsens eine regulatorische Rolle auf die durch LPA induzierte Neuritenretraktion besitzen könnte. Neuronale Zelllinie (N1E-115), die mit einem PRG-1-EGFP Fusionsprotein transfiziert wurden, waren offensichtlich gegen eine LPA induzierte Neuritenretraktion geschützt. Außerdem konnte im Überstand die 5-fache Menge an LPA Degradationsprodukt, dem MAG, nachgewiesen werden als bei untransfizierten Zellen (Brauer et al., 2003). Bei der Transfektion einer PRG-1 Mutante mit einer Punktmutation in einer Phosphatasedomäne (H253K) konnten diese Beobachtungen nicht gemacht werden. Bräuer et al. nahmen somit an, dass PRG-1 die durch LPA induzierte Neuritenretraktion durch eine Ekto-Phosphatase Aktivität beeinflussen kann.

Die Tatsache, dass PRG-1 in zwei Phosphatasedomänen drei nicht-konservierte Aminosäureaustausche aufweist, die laut einem beschriebenen Sequenzmotiv essentiell für den Reaktionsmechanismus der Lipid Phosphatasen sind (Stukey und Carman, 1997), ließen Forscher um Andrew Morris 2004 an der Ekto-Phosphatase Aktivität von PRG-1 zweifeln (McDermott et al., 2004). Die Gruppe konnte zeigen, dass im Gegensatz zu neuronalen Zellen nichtneuronale HEK293-Zellen, wenn sie mit PRG-1-EGFP transfiziert werden, keine erhöhte LPA Phosphatase Aktivität zeigen (McDermott et al., 2004). Die von Bräuer et al. beobachteten morphologischen Veränderungen in neuronalen Zellen müssten daher aufgrund anderer biologischer Aktivitäten von PRG-1 erklärt werden.

Neue Erkenntnisse wurden in letzter Zeit durch die Arbeiten von Trimbuch et al. (2009) erlangt. Das Ausschalten von PRG-1 führte zu epilepsieartigen Anfällen in der PRG-1 KO Maus. Es konnte gezeigt werden, dass diese Übererregbarkeit gendosisabhängig ist, was gegen eine enzymatische Funktion des Proteins spricht. Es konnte aber auch beobachtet werden, dass bei der PRG-1 KO Maus die Fähigkeit, bioaktives Lipid aufzunehmen, stark

eingeschränkt ist. Es scheint also, dass PRG-1 trotz fehlender Enzymaktivität die LPA-Konzentration an der Synapse kontrollieren kann. So könnte PRG-1 eine sensorische oder Rezeptor/Transporter-Funktion erfüllen (Trimbuch et al., 2009). Die Tatsache, dass in der PRG-1/LPA<sub>2</sub>-Rezeptor-Doppel-KO-Maus weder die Übererregbarkeit an der Synapse noch die epileptischen Aktivitäten der PRG-1-KO-Maus beobachtet wurden, lässt darauf schließen, dass PRG-1 die LPA-vermittelten exzitatorischen Transmissionen über den LPA<sub>2</sub>-Rezeptor beeinflusst.

## **A.8 Technischer Hintergrund**

### **A.8.1 EGFP transgene Mäuse**

Seit sich der Fokus in der molekularen Neurobiologie von Experimenten mit Gewebekulturen zu *in vivo* Studien verlagert hat, wurde die Expression von Transgenen im Nervensystem der Maus zu einem der grundlegenden Experimente (Caroni, 1997). Im Gegensatz zu viralen Expressionssystemen hat die Einbringung von Transgenen in die Keimbahn von Mäusen den entscheidenden Vorteil, stabile Linien von genetisch veränderten Tieren zu erzeugen (Caroni, 1997). Caroni stellt in seiner Veröffentlichung 1997 eine Expressionskassette von dem Thy-1.2-Gen der Maus vor. Dieses Konstrukt wurde später verwendet, um Thy-1-mGFP-Mäuse zu erzeugen, die membrangebundenes enhanced GFP (EGFP) in verschiedenen Zelltypen exprimieren. mGFP besteht aus den ersten 40 Aminosäuren des Proteins MARCKS, einer Bindungssequenz für das Plasmalemma (Wiederkehr et al., 1997), die an EGFP gebunden sind (De Paola et al., 2003). Bei EGFP handelt es sich um eine mutierte Variante des GFPs aus der Qualle *Aequorea victoria*, die eine 20 – 30-fach höhere Fluoreszenzintensität aufweist als das Wildtyp-Protein. Das Exitationsmaximum dieser Mutante hat sich von 395 nm zu 488 nm verschoben. Dadurch wird dieses EGFP für die Wissenschaft noch wertvoller, da es mit einem gängigen Argon-Laser bei 488 nm optimal angeregt werden kann (Morise et al., 1974; Cormack et al., 1996).

Thy-1 ist ein Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-gekoppeltes Oberflächen-Glycoprotein, das postnatal in verschiedenen Geweben und Zelltypen exprimiert wird, inklusive dem Thymus, dem Nervensystem und den Fibroblasten (Gordon et al., 1987; Morris, 1992). Ein wichtiges Merkmal dieser speziellen Expressionskassette ist die Tatsache, dass die Deletion der Gensequenz für das Thy-1-Protein, die durch das Einbringen der EGFP-cDNA entsteht, die Expression des Transgens im Thymus eliminiert (Caroni, 1997; Feng et al., 2000). Dadurch erhält man ein System, das eine starke und konstitutive transgene Expression in den Neuronen von adulten Mäusen aufweist. Im Laufe der Zeit entstanden insgesamt etwa 60

verschiedene Mauslinien, die eines der XFPs (ECFP, EGFP, EYFP, DsRed1) in verschiedenen Teilen des Nervensystems unter dem Thy-1 Promotor exprimieren (Feng et al., 2000).

Eine weitere Mauslinie exprimiert EGFP unter der Kontrolle des Hühner  $\beta$ -aktin Promotors und dem Zytomegalovirus Enhancer. Die cDNA von einem EGFP wurde von Okabe et al. 1997 in den pCAGGS Vektor kloniert, der außer den oben genannten Eigenschaften noch ein  $\beta$ -aktin Intron und ein bovines Globin Polyadenylierungssignal enthält. Außer in Erythrozyten und Haaren exprimiert diese transgene Maus EGFP in allen Gewebe- und Zelltypen (Okabe et al., 1997).

### **A.8.2 2-Photonen-Laserrastermikroskopie (2PLSM)**

Die Arbeitsweise eines Multiphotonenmikroskops bzw. 2-Photonenmikroskops ähnelt der eines konfokalen Laserrastermikroskops (CLSM). Der Laserstrahl wird durch das Objektiv auf einen Punkt des Präparats fokussiert und um ein vollständiges Bild des Objektes zu erhalten, muss dieses abgerastert werden.

Bei der CLSM wird in einem fluoreszierenden Molekül ein Elektron durch die Absorption eines Photons angeregt, d. h. auf ein höheres Energieniveau gehoben. Die Energie wird zwischengespeichert, bevor das Elektron unter Abgabe eines neuen Photons wieder in seinen Ursprungszustand zurückfällt. Bei der 2PLSM wird die Anregung des Elektrons durch die gleichzeitige Absorption *zweier* Photonen hervorgerufen, die in der Summe die gleiche Energie haben wie sonst das *eine* Anregungsphoton. Voraussetzung ist, dass beide Photonen gleichzeitig eintreffen, da kein stabiles Zwischenprodukt existiert.

Bei der CLSM hat das anregende Photon eine kürzere Wellenlänge, höhere Frequenz und damit mehr Energie als das abgegebene Photon. Bei der 2PLSM wird mit Photonen angeregt, die eine größere Wellenlänge, niedrigere Frequenz und somit pro Photon weniger Energie haben als das ausgesandte Photon. Die Anregungswellenlänge beträgt etwa das Doppelte der bei der CLSM verwendeten Wellenlänge.

Um ein gleichzeitiges Eintreffen zweier Photonen im Fokuspunkt zu erreichen, sind sehr hohe Photonendichten erforderlich. Diese werden durch gepulste Laser erreicht, die sehr kurze, intensive Laserpulse aussenden, die z. B. 80 Millionen mal pro Sekunde wiederholt werden. Es kommt nur im Fokuspunkt zu einer genügend hohen Photonendichte, um eine Fluoreszenzanregung zu erzeugen, die Lichtintensitäten außerhalb der Fokusebene reichen für die Erzeugung von Fluoreszenz nicht aus.

Die Vorteile eines solchen Systems sind folgende:

- Das Ausbleichen von Fluoreszenzfarbstoffen und die Erzeugung von Phototoxizität ist auf einen sehr kleinen Punkt im Präparat beschränkt
- Die Zerstörung durch UV-Licht ist ausgeschlossen
- Im Gegensatz zu CLSM ist keine Lochblende erforderlich, um Licht aus anderen Ebenen auszufiltern. Die gesamte vom Objektiv aufgefangene Fluoreszenz kann ohne Verlust für das zu erstellende Bild verwendet werden
- Längerwelliges Licht, was bei der 2PLSM zur Anregung verwendet wird, hat durch geringere Streuung eine höhere Eindringtiefe.

Durch die genannten Vorteile sind Aufnahmen von lebenden Gewebe möglich, ohne dieses maßgeblich zu schädigen. Außerdem können entsprechend tiefere Regionen in Organismen und Hirnschnittkulturen erreicht werden. Aus diesen Gründen wurde diese Methode im Rahmen dieser Arbeit für die Lebendmessungen des axonalen Auswachsens eingesetzt.

## **A.9 Ziel der Arbeit**

Die Expression von PRG-1 beginnt im sich entwickelnden Gehirn zu einem Zeitpunkt, an dem axonale Projektionen gebildet werden. Zusätzlich wird PRG-1 nach einer Kortextläsion, auf die axonales Aussprossen folgt, hochreguliert, woraufhin angenommen wurde, dass PRG-1 an dem Prozess des axonalen Auswachsens maßgeblich beteiligt ist. In dem 1. Teil der vorliegenden Arbeit sollte diese Rolle von PRG-1 näher untersucht werden. Dazu sollten Unterschiede im axonalen Auswachsverhalten zwischen einer PRG-1 normal exprimierenden und einer PRG-1 defizienten Maus untersucht werden. Die verwendeten Kultur-Modelle sollte Aufschluss darüber geben

- inwieweit die Innervation des Hippokampus bei PRG-1 defizienten Fasern beeinflusst ist. Quantitativ sollte dies durch Fluoreszenz-Intensitätsmessungen analysiert werden.
- ob und in welchem Maße die Mobilität der auswachsenden Axone variiert. Die Etablierung einer Anlage, die Lebendmessungen möglich macht, sollte Aufschluss darüber geben.
- inwieweit die neuronale Aktivität bei PRG-1 defizienten Neuronen eine Rolle spielt. Hierfür sollte das axonale Auswachsen nach Blockierung von Ionenkanäle bestimmt werden.

Da frühere Analysen eine postsynaptische Lokalisation von PRG-1 zeigten, sollte im 2. Teil dieser Arbeit die Entwicklung der Spines in einer PRG-1 KO Maus untersucht werden. Um die mögliche Funktion von PRG-1 während der Spinogenese zu analysieren,

- sollten die Untersuchungen durch die Kreuzung der PRG-1 KO Maus mit einer EGFP-exprimierenden Maus *in vivo* erfolgen.
- durch das Ausschalten von PRG-1 in einzelnen Zellen durch *in utero* Elektroporation der Effekt der PRG-1 Defizienz auf Einzelzellebene gezeigt werden.
- der Einfluss der PRG-1 Überexpression auf die Spinemorphologie gezeigt werden. Aus Mangel an einer PRG-1 überexprimierenden Maus wurden hierfür primäre hippocampale Neurone *in vitro* verwendet.

## B.1 Material

### B.1.1 Chemikalien und Medien

| <b>Produktbeschreibung</b>                        | <b>Hersteller, Artikel Nr.</b> |
|---|--------------------------------|
| Agar-Agar   | Roth, 2266.2                   |
| Agarose   | peqLab, 35-1020                |
| B-27 Supplement                                   | Invitrogen, Gibco 17504-044    |
| Basal Medium Eagle (BME)                          | Invitrogen, Gibco 41010        |
| Borsäure  | Roth, 6943.1                   |
| Calciumchlorid                                    | Merck, 1.02389.1000            |
| 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)                        | Sigma-Aldrich, D5637           |
| 4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) | Roche, 236276                  |
| Dinatriumhydrogenphosphat                         | Roth, 8030.2                   |
| Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat                | Roth, 4984.1                   |
| Dinatriumhydrogenphosphat Heptahydrat             | Roth, X987.2                   |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)           | PAN Biotech, P04-03550         |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)                           | Roth, !994.1                   |
| EDTA  | Roth, 8043.2                   |
| Eisessig  | Roth, 6755.2                   |
| Entellan  | EMS, 14800                     |
| Ethanol   | Herbeta Arzneimittel, MEK      |
| Ethidiumbromid                                    | Roth, 7870.1                   |
| Fetales Kälberserum (FCS)                         | PAN Biotech, 3302-P250330      |
| Glucose   | Roth, X997.2                   |
| Glucoselösung 20%                                 | B. Braun, 7306C12              |
| Glycerol  | Roth, 3783.1                   |
| Hank's buffered salt solution (HBSS)              | Invitrogen, Gibco 14170        |
| Hefeextrakt                                       | Roth, 2363.2                   |
| HEPES   | Sigma, H6147                   |
| Histoacryl  | B. Braun, 1050052              |
| Immo-Mount  | Thermo Scientific, 9990402     |
| Isotonische Kochsalzlösung, 0,9% NaCl             | Fresenius, 6178532             |
| Kaliumacetat                                      | Roth, 4986.1                   |

---

|   |                             |
|---|-----------------------------|
| Kaliumchlorid                                 | Merck, 1.04936.1000         |
| Kaliumdihydrogenphosphat                      | Merck, 1.04873.1000         |
| Kanamycinsulfat                               | Roth, T832.2                |
| Ketamin                                       | CuraMed Pharma, 8514224     |
| Kollagen Typ I, aus Rattenschwanz             | Sigma, C-7661               |
| L-Glutamat                                    | Sigma, G5889                |
| L-Glutamin                                    | Invitrogen, Gibco 25030-024 |
| L-Glutamin ( GlutaMAX™-I Supplement )         | Invitrogen, Gibco 35050     |
| Minimal Essential Medium (MEM), Earle's Salze | Invitrogen, Gibco 31095     |
| Minimal Essential Medium (MEM), Hank's Salze  | Invitrogen, Gibco 11012     |
| Natriumchlorid                                | Roth, 9265.2                |
| Natriumdihydrogenphosphat                     | Merck, 1.04936.1000         |
| Natriumdodecylsulfat (SDS)                    | Serva, 20760                |
| Natriumethylmercurithiosalicylat (Thimerosal) | Roth, 6389.2                |
| Natriumhydrogencarbonat                       | Merck, 1.06329.1000         |
| Natriumhydroxid                               | VWR, 28245.298              |
| Neurobasal Medium                             | Invitrogen, Gibco 21103     |
| Normales Ziegen Serum (NGS)                   | Vector Laboratories, S-1000 |
| Normales Pferdeserum (NHS)                    | Invitrogen, Gibco 26050-088 |
| Paraformaldehyd (PFA)                         | Merck, 104004.0800          |
| Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)           | PAN Biotech, P06-07100      |
| Peptone aus Casein                            | Roth, 8986.2                |
| Poly-L-Lysin (PLL)                            | Sigma-Aldrich, P2636        |
| Propidiumiodid                                | Roth, CN74.1                |
| Rompun  | Bayer Healthcare, 35464     |
| Tris Base                                     | Sigma, T1503                |
| Triton X-100                                  | Sigma-Aldrich, X100         |
| Trypsin, 2,5%                                 | Invitrogen, Gibco 15090-046 |

**B.1.2 Kits****Produktbeschreibung**

Effectene Transfection Reagent  
 Invisorb Spin Tissue Mini Kit  
 (Präparation genomischer DNA)  
 Nucleobond AX  
 (Maxipräparation Plasmid-DNA)  
 Vectastain ABC Kit

**Hersteller**

Qiagen, 301425  
 Invitex, 10321003  
 Macherey-Nagel, 740.574.50  
 Vector laboratories, PK-6100 standard

**B.1.3 Zubehör****Produktbeschreibung**

Deckgläser eckig  
  
 Deckgläser rund  
 Deckgläser rund  
 Glas Pasteur Pipetten  
 Plexiglaskammer  
 Mikroskoptisch  
 Neubauer Zählkammer  
 Kanülen  
 Objektträger  
 Objektträger Superfrost  
 PCR-Gefäße  
 Petrischalen  
 Pipetten  
 Pipettenspitzen  
 Präparierbesteck  
 Rasierklingen  
  
 Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2 ml)  
 Skalpellklingen abgerundet

**Hersteller**

Menzel-Gläser, 24 x 50 mm,  
 BB024050A1  
 Menzel-Gläser, d 20 mm, CB00200RA1  
 VWR, d 40 mm, 631-0177  
 Volac, 230 mm, gestopft, D812  
 Life Imaging Services, 'Ludin chamber'  
 Merzhäuser  
 VWR  
 B.Braun  
 R. Langenbrinck, 76 x 26 mm, Mattrand  
 R. Langenbrinck, 03-0060  
 Sarstedt, 72991992  
 Nunc  
 Eppendorf  
 Sarstedt  
 Fine Science Tools  
 Wick Pharma / P&G GmbH,  
 Rotbart extra dünn 8626928  
 Sarstedt  
 Feather, 02.010.00.015

|                                 |                                       |
|---------------------------------|---------------------------------------|
| Skalpellklingen spitz           | Feather, 02.010.00.011                |
| Spritzen                        | B. Braun                              |
| Sterilfilter                    | Sartorius, 17597                      |
| Vacuum Filtersystem             | Corning, 430767                       |
| Zellkultureinsätze              | Millipore, Millicell 0,4 µm PICMORG50 |
| Zellkulturflaschen              | BD Falcon                             |
| Zellkulturplatten, 6 well       | Falcon, 353046                        |
| Zellkulturplatten, 12 well      | Falcon, 353043                        |
| Zellkulturröhrchen ( 15/50 ml ) | Falcon; Sarstedt                      |

#### B.1.4 Geräte und Software

##### Produktbeschreibung

Binocular  
 Brenner  
 CorelDraw  
 Digitalkamera Fluoreszenzmikroskope  
 Elektrophoresesystem, DNA  
 Fluoreszenzmikroskope:  
 BX 50, IX 70, IX 81  
 Geldokumentation, UV-System  
 Geldokumentation, Kamera  
 Gewebeschneider  
 GraphPad Prism 4.0  
 Image J  
 Inkubatoren (Zellkultur)  
 Konfokale Mikroskope:  
 TCS SL, TCS SP2  
 Laser: Argon 488, Helium-Neon 543,  
 Helium-Neon 633  
 Laser: Titan:Sapphire Chameleon  
 Microsoft office

##### Hersteller

Zeiss, KL 1500  
 WLD Tec  
 Corel Corporation, Ottawa, Kanada  
 Visitron Systems, Photometrics CoolSnap ES  
 Thermo Scientific, Easycast  
 Olympus  
 Intas  
 PCO imaging, sensicam & CamWare V1.10  
 Mcllwain Tissue Chopper  
 San Diego, CA, USA  
<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>  
 Binder  
 Leica  
 Leica  
 Coherent  
 Microsoft Corporation

|                         |   |
|-------------------------|---|
| Millipore Typ I Wasser  | Milli-Q Synthesis A10 System<br>Aus Elix-5 Water Purification System:<br>Ultrareines Wasser, für molekularbiologische<br>Zwecke geeignet. |
| Millipore Typ II Wasser | Elix-5 Water Purification System<br>Aus Leitungswasser: Deionisiertes und<br>gefiltertes Wasser, für analytische Zwecke<br>geeignet.      |
| Photoshop 6.0           | Adobe   |
| Power supply            | Biorad, Power Pac 200   |
| Sonifier                | Bandelin Elektronik, SH70G  |
| Thermo cycler           | Biorad  |
| Thermoschüttler         | Eppendorf, Thermomixxer   |
| UV-Lampe                | Nightsea bluestar, Tektite, Trenton, USA  |
| Velocity 4.0            | improvision   |
| Vibratom                | Microm, HM 650 V  |
| Zentrifuge              | Heraeus, Biofuge  |

### B.1.5 Versuchstiere, Zellen, Bakterien

#### Versuchstiere / Zelllinien

β\_aktin\_EGFP

C57BL/6

Thy-1.2-EGFP\_L17

Thy-1.2-EGFP\_L21

PRG-1 KO

LPA<sub>2</sub>-R KO

HEK293-Zellen

*E. coli* XL10Gold

#### Herkunft

M. Okabe, Osaka Universität Japan

Forschungseinrichtung für experimentelle  
Medizin, Charité Berlin

P. Caroni, FMI Schweiz

P. Caroni, FMI Schweiz

T. Trimbuch, Charité Berlin

J. Chun, University of California, San Diego

Humane embryonale Nierenzelllinie (DSMZ)

Stratagene

## B.1.6 Antikörper

**Tab. 1: primäre Antikörper**

| Bezeichnung                                      | Wirt                      | Konzentration | Hersteller              |
|--|---------------------------|---------------|-------------------------|
| Anti-Calbindin D-28k                             | Maus                      | 1:2000        | Swant, Nr. 300          |
| Anti-Flag®M2                                     | Maus                      | 1:1000        | Sigma, F1804            |
| Anti-GFP   | Maus                      | 1:1000        | SynapticSystems, 132011 |
| Anti-GFP   | Kaninchen                 | 1:1000        | Abcam, ab6556           |
| Anti-MAP2  | Maus                      | 1:1000        | Sigma, M4403            |
| Phalloidin-Tetramethylrhodamine B isothiocyanate | Grüner Knollenblätterpilz | 0,1 µg / ml   | Sigma, P1951            |
| Anti-PRG1  | Kaninchen                 | 1:750         | Eigenherstellung        |

**Tab. 2: sekundäre Antikörper**

| Bezeichnung              | Wirt  | Konzentration | Hersteller         |
|--------------------------|-------|---------------|--------------------|
| Anti-rabbit Alexa 488    | Ziege | 1:1000        | Invitrogen, A11008 |
| Anti-rabbit Alexa 568    | Ziege | 1:1000        | Invitrogen, A11011 |
| Anti-mouse Alexa 488     | Ziege | 1:1000        | Invitrogen, A11001 |
| Anti-mouse Alexa 568     | Ziege | 1:1000        | Invitrogen, A1104  |
| Anti-rabbit biotinyliert | Ziege | 1:1000        | Vector, BA-1000    |

Die Antikörper wurden mit 0,1 M PB verdünnt und zur Lagerung mit 0,02% Thimerosal versehen.

## B.1.7 Inhibitoren

**Tab. 3: verwendetet Inhibitoren**

| Substanz                                    | Inhibition                               | Konzentration | Lösungsmittel              | Hersteller   |
|---|--|---------------|----------------------------|--------------|
| Tetrodotoxin (TTX)                          | Na <sup>+</sup> -Kanäle                  | 1 µM          | 0,1 M Acetatpuffer, pH 7,4 | Sigma, T8024 |
| Nifedipin                                   | Ca <sup>2+</sup> -Kanäle (L-Typ)         | 10 µM         | DMSO                       | Sigma, N7634 |
| 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) | AMPA/Kainat Glutamat-rezeptor Antagonist | 20 µM         | H <sub>2</sub> O           | Sigma, C239  |

## B.1.8 Konstrukte

Tab. 4: verwendete Konstrukte

| Vektor/Konstrukt | Antibiotika          | Hersteller/Firma        |
|------------------|----------------------|-------------------------|
| pEGFP-N1         | Kanamycin (25 µg/ml) | BD Biosciences Clontech |
| pFlag-mPRG-1     | Kanamycin (25 µg/ml) | M. Pockrand/T. Trimbuch |

## B.1.9 Kulturmedium

### Inkubationsmedium für hippokampale Schnittkulturen

Ansatz für 100 ml

- 25 ml MEM, Hank´s Salze, 2-fach konzentriert
- 20,9 ml Millipore Typ II Wasser
- 25 ml BME
- 25 ml NHS
- 1 ml Glutamax, 200 mM
- 3,125 ml 20%ige Glucoselösung

Sterilfiltrieren

pH auf 7,3 einstellen mit sterilem **1 M NaOH**

- 2 g NaOH
- 50 ml Millipore Typ II Wasser

### Plattierungsmedium für primäre Neurone

Ansatz für 50 ml

- 1,5 ml 20%ige Glucoselösung
- 5 ml NHS
- 0,5 ml Pen/Strep, 100x
- 43 ml MEM, Earle´s salts

Sterilfiltrieren

### Wachstumsmedium für primäre Neurone

Ansatz für 50 ml

- 1 ml B27 Supplement, 50x
- 125 µl L-Glutamin, 200 mM
- 0,5 ml Pen/Strep, 100x

- 48,375 ml Neurobasal Medium
- Sterilfiltrieren

### **HEK293-Zellmedium**

Ansatz für 500 ml

- 50 ml FCS
- 5 ml L-Glutamin
- 5 ml Pen/Strep, 100x
- 440 ml DMEM

### **DYT Medium**

Ansatz für 1000 ml

- 16 g Pepton
- 10 g Hefeextrakt
- 5 g NaCl
- 1 l Millipore Typ II Wasser

pH mit 5 N NaOH auf 7,0 einstellen

autoklavieren

Zugabe von 25 µg/ml Kanamycin

### **Agarplatten**

Ansatz für 1000 ml

- 1 l DYT Medium
- 20 g Agar

autoklavieren

Zugabe von 25 µg/ml Kanamycin

## **B.1.10 Puffer und Lösungen**

### **Agarose-Gel**

Ansatz für 350 ml, 1 %ig

- 3,5 g Agarose
- 350 ml 1x TBE-Puffer

aufkochen und lösen in der Mikrowelle

Zugabe von 35 µl Ethidiumbromid-Lösung

### **Boratpuffer**

Ansatz für 1000 ml 0,1 M Puffer

- 6,18 g Borsäure (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>)
- 1000 ml Millipore Typ II Wasser

pH auf 8,5 einstellen, unsteril

### **2 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung**

Ansatz für 100 ml

- 29,4 g CaCl<sub>2</sub>
- 100 ml Millipore Typ II Wasser

sterilfiltrieren

### **DAPI Stocklösung**

Ansatz für 500 ml, Konzentration 2 µg/ml

- 1 mg DAPI
- 500 ml 0,1 M PB

Ultraschallbad

Zum Gebrauch 1:10 auf 0,2 µg/ml verdünnen

### **0,5 M EDTA**

Ansatz für 10 ml

- 1,86 g EDTA
- 10 ml Millipore Typ I Wasser

### **0,1 M Essigsäure**

Ansatz für 1000 ml

- 5,7 ml Eisessig
- 994,3 ml Millipore Typ II Wasser

### **Ethidiumbromid-Lösung**

Ansatz für 50 ml, Konzentration 5 mg/ml

- 0,25 g Ethidiumbromid
- 50 ml Millipore Typ II Wasser

**Fixativ**

Ansatz für 1000 ml

- 40 g PFA
- 960 ml 0,1 M PB

rühren und erhitzen bis 72°C

Zugabe von NaOH zur Klärung der Lösung

auf Eis abkühlen

pH auf 7,3 einstellen

filtrieren und in Aliquots lagern bei -20°C

**HEPES-Puffer**

Ansatz für 300 ml

- 3 g HEPES
- 0,222 g KCl
- 0,06 g Glucose
- 0,075 g Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ )
- 200 ml Millipore Typ I Wasser

pH auf 7,15 einstellen, auffüllen mit Millipore Typ I Wasser

sterilfiltrieren

**Ketamincocktail**

Ansatz für 50 ml

- 10 ml Ketamin (50 mg)
- 4 ml Rompun (2%)
- 36 ml 0,9% NaCl

**Kollagenlösung**

Ansatz 2 mg/ml

- 50 mg Kollagen Typ I
- 25 ml 0,1 M Essigsäure ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )

über Nacht lösen

**Kollagenlösung pH 7,4 (wird kurz vor Gebrauch auf Eis angesetzt)**

- 1 ml Kollagenlösung
- 50 µl DMEM
- 100 µl Kollagenpuffer

**Kollagenpuffer**

Ansatz für 50 ml

- 1,6 g NaOH
- 1,1 g Natriumhydrogenkarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )
- 50 ml Millipore Typ II Wasser

**Lysispuffer E2 ('Minipräp')**

Ansatz für 100 ml

- 10 ml 10% SDS
- 20 ml 1 M NaOH
- 70 ml Millipore Typ I Wasser

**Neutralisierungspuffer E3 ('Minipräp')**

Ansatz für 100 ml

- 29,41 g Kaliumacetat
- 11,5 ml Eisessig
- 88,5 ml Millipore Typ I Wasser

**0,2 M PB**

Lösung 1

- 28,4 g Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
- 1000 ml Millipore Typ II Wasser

Lösung 2

- 8,28 g Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )
- 300 ml Millipore Typ II Wasser

Zugabe von Lösung 2 zu Lösung 1 bis ein pH von 7,3 erreicht ist

**0,1 M PB**

Ansatz für 1000 ml

- 500 ml 0,2 M PB
- 500 ml Millipore Typ II Wasser

**0,1 M PBS**

Ansatz für 1000 ml

- 8,1 g NaCl
- 0,2 g KCl

- 2,9 g Dinatriumhydrogenphosphat Heptahydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ )
- 0,24 g Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- 1000 ml Millipore Typ II Wasser

Bei Bedarf autoklavieren oder sterilfiltrieren

### **PI Stocklösung**

Ansatz für 10 ml, Konzentration 500 µg/ml

- 5 mg PI
- 10 ml 0,1 M PBS

Zum Gebrauch 1:100 auf 5 µg/ml verdünnen

### **PLL Stocklösung**

Ansatz für 20 ml, Konzentration 10 mg/ml

- 200 mg PLL
- 20 ml 0,1 M Boratpuffer

in 1 ml Aliquots lagern bei  $-20^\circ\text{C}$

### **Resuspensionspuffer E1 ('Minipräp')**

Ansatz für 50 ml

- 1 ml 0,5 M EDTA
- 1,25 ml 1 M Tris, pH 8,0
- 5 mg RNase
- 5 mg Lysozym
- 50 ml Millipore Typ I Wasser

### **10% SDS**

Ansatz für 1000 ml

- 100 g SDS
- 800 ml Millipore Typ I Wasser

unter Rühren auflösen, auffüllen mit Millipore Typ I Wasser

### **10x TBE-Puffer**

Ansatz für 1000 ml

- 108 g Trisbase
- 55 g Borsäure
- 40 ml 0,5 M EDTA

- 960 ml Millipore Typ II Wasser

Zum Gebrauch 1:10 verdünnen (1x TBE-Puffer)

### **1 M Tris**

Ansatz für 500 ml

- 60,55 g Trisbase
- 350 ml Millipore Typ I Wasser

gewünschten pH mit HCl oder NaOH einstellen, auffüllen mit Millipore Typ I Wasser

### **Tyrode**

Ansatz für 1000 ml Puffer

- 8 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 0,05 g  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$
- 1 g Glucose
- 1000 ml 0,1 M PB

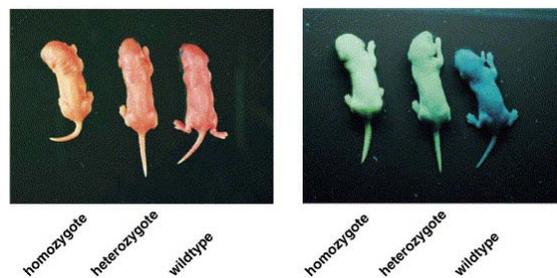
pH auf 7,35 einstellen

## B.2 Molekularbiologische Methoden

### B.2.1 Genotypisierung transgener Tiere mittels UV-Licht

Die in dieser Arbeit verwendeten Tiere,  $\beta$ \_aktin\_EGFP und Thy-1.2-EGFP\_L17, konnten mittels UV-Licht auf ihre Transgenität getestet werden.

Bei den  $\beta$ \_aktin\_EGFP Mäusen wird das GFP-Signal mit dem Auge sichtbar, wenn die Tiere mit einer UV-Lampe (254 nm / 366 nm) bestrahlt werden, da die Expression auch in den Hautzellen stattfindet (Abbildung 7).



**Abbildung 7:** *Der  $\beta$ \_aktin\_EGFP Maus-Stamm. Links unter sichtbarem Licht, rechts unter UV-Licht. Homozygote Tiere lassen sich leicht durch ihre starke grüne Färbung von heterozygoten und Wildtyp Tieren unterscheiden (Hechler et al., 2006).*

Da bei den Thy-1.2-EGFP\_L17 Tieren GFP nur im Gehirn und Rückenmark sichtbar exprimiert wird, wurde eine UV-Lampe mit einer gelben Filterbrille (Nightsea, Bluestar) benutzt. Positive Tiere konnten dann leicht an ihrem grünen Köpfchen von negativen Tieren unterschieden werden. Alternativ konnten diese Tiere auch mit einer PCR genotypisiert werden, die der PCR von den Thy-1.2-EGFP\_L21 Tieren in Abschnitt B.2.3 entspricht.

### B.2.2 Präparation genomischer DNA aus Biopsien von Mäuseschwänzen

Die Präparation genomischer DNA für die PCR erfolgte mit dem 'Invisorb Spin Tissue Mini Kit' von Invitex nach Anweisung des Herstellers. Änderungen wurden wie folgt durchgeführt: die tiefgefrorenen Mäuseschwanzbiopsien wurden in 200  $\mu$ l Lysis Puffer mit 20  $\mu$ l Proteinase K bei 52°C für mindestens 2 Stunden inkubiert (Wasserbad oder Thermoschüttler). Nach Zentrifugation bei 13000 g für 2 Minuten wurden 100  $\mu$ l

Bindungspuffer zum Überstand gegeben, gemischt und in den vom Hersteller mitgelieferten Säulen für 1 Minute inkubiert. Nach Zentrifugation bei 13000 g für 1 Minute wurde der Durchfluss verworfen und die Säule einmal mit 500 µl Waschpuffer gereinigt. Die Säulen wurden getrocknet, indem nochmals mit gleichen Parametern zentrifugiert wurde. Zum Eluieren der DNA wurden die Säulen in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und mindestens 1 Minute bei Raumtemperatur mit 100 µl aufgewärmten (52°C) Elutionspuffer inkubiert. Die abschließende Zentrifugation erfolgte bei 13000 g für 1 Minute.

### B.2.3 Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die in dieser Arbeit verwendeten Tiere Thy-1.2-EGFP\_L21 und PRG-1 KO mussten mittels einer PCR auf die jeweilige Veränderung ihres Erbguts getestet werden. Die Primer wurden in einer Konzentration von 10 pmol / µl verwendet. Die verwendete GoTaq™ DNA Polymerase wurde von Promega (M3005) bezogen.

**Tab. 5: Verwendete Primer für Thy-1.2-EGFP\_L21**

| Nr | Primer 5' - 3' | Sequenz                       | Tm     |
|----|----------------|-------------------------------|--------|
| 1  | Thy fw         | GAG GTA TTC AGT CAT GTG CTC C | 60,3°C |
| 2  | Thy rev        | CTG AGA CTA TGG CAA AGA GGC   | 59,8°C |
| 3  | Thy/EGFP rev   | GCG GCC GCT TTA CTT GTA CA    | 59,4°C |

**Tab. 6: Verwendete Primer für PRG-1 KO**

| Nr | Primer 5' - 3'      | Sequenz                             | Tm     |
|----|---------------------|-------------------------------------|--------|
| 4  | Neo-kPCR 7 fw       | GGG CTG ACC GCT TCC TCG TGC TTT AC  | 69,5°C |
| 5  | PRG1-gPCR-12681 fw  | CCG TGA TTG CTT GTT CCT TCT AGT GTG | 64,9°C |
| 6  | PRG1-gPCR-13387 rev | TCG GGG ATG TGC ACC AAT TGG GAA GAG | 68°C   |

**Tab. 7: PCR Ansatz:**

| Komponente                    | Menge    |
|-------------------------------|----------|
| Millipore Typ I Wasser        | 15,25 µl |
| 5 x GoTaq-PCR-Puffer          | 5,0 µl   |
| dNTPs (2,5 mM)                | 1,0 µl   |
| Primer fw + rev               | 0,5 µl   |
| GoTaq DNA-Polymerase (5 U/µl) | 0,25 µl  |
| DNA-Template                  | 2,0 µl   |

Für die Genotypisierung wurden folgende PCR-Programme verwendet:

**Tab. 8: PCR Programm PRG-1 KO**

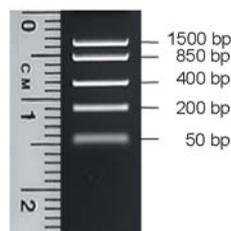
| Temperatur       |       | Zeit    |             |
|------------------|-------|---------|-------------|
| Denaturierung    | 95 °C | 3 min   | } 30 Zyklen |
| Denaturierung    | 95 °C | 0,5 min |             |
| Primeranlagerung | 63 °C | 0,5 min |             |
| Polymerisation   | 72 °C | 0,5 min |             |
|                  | 72 °C | 5 min   |             |

**Tab. 9: PCR Programm Thy-1.2-EGFP**

| Temperatur       |       | Zeit    |             |
|------------------|-------|---------|-------------|
| Denaturierung    | 95 °C | 3 min   | } 30 Zyklen |
| Denaturierung    | 95 °C | 0,5 min |             |
| Primeranlagerung | 58 °C | 0,5 min |             |
| Polymerisation   | 72 °C | 1 min   |             |
|                  | 72 °C | 5 min   |             |

## B.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Größenbestimmung der amplifizierten DNA-Fragmente wurden 1 %ige Agarose-Gele verwendet. Die PCR-Produkte mussten nicht mehr mit Auftragspuffer versetzt werden, da dieser in dem grünen GoTaq PCR Puffer schon enthalten war. Die Elektrophorese wurde in 1x TBE Puffer und bei einer Spannung von 100 – 130 Volt durchgeführt. Als Größenmarker wurde der FastRuler™ (low range) von Fermentas (SM 1103) benutzt (Abbildung 8).



**Abbildung 8 : FastRuler™ low range von Fermentas.**

### **B.2.5 Hitzetransformation**

Zur Herstellung von transgenen Bakterien wurde der *E.coli* Stamm XL10-Gold verwendet. Die tiefgefrorenen chemisch kompetenten Bakterien (400 µl) wurden langsam auf Eis aufgetaut und mit 1 µg Vektor versetzt. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien 30 Sekunden bei 42°C erhitzt und danach mit 900 µl DYT Medium gemischt. Diese Suspension wurde 1 Stunde bei 37°C geschüttelt und dann auf einer Agarplatte mit Kanamycin ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

### **B.2.6 DNA-Minipräparation und Glycerolkulturen**

Am Vorabend wurden 5 ml DYT-Medium (mit Kanamycin) mit einer Kolonie, die das gewünschte Plasmid trug, von einer Agarplatte angeimpft. Die Plasmidaufreinigung erfolgte hier nach Anleitung von SEQLAB-Laccone.

Durch einen Kontrollverdau wurde überprüft, ob das gewünschte Plasmid isoliert wurde. Ein Verdau von pEGFP-N1 mit EcoR1 ergab 1 Bande von 4,7 kbp, ein Verdau vom pFlag-mPRG-1 mit PvuI ergab jeweils 1 Bande bei 600 bp und 4,5 kbp (Enzyme Biolabs).

600 µl dieser Übernachtskultur wurden auf Eis mit 600 µl sterilem 100 %igem Glycerol gemischt und bei -80°C gelagert.

### **B.2.7 DNA-Maxipräparation**

Für die Transfektion von eukaryontischen Zellen wurden Plasmide mit einem hohen Reinheitsgrad benötigt. Dafür wurden am Vorabend 200 ml antibiotikahaltiges DYT-Medium mit dem gewünschten transgenen Bakterium angeimpft. Die Plasmidpräparation erfolgte hier am nächsten Morgen mit dem NucleoBond Maxi Kit von Machery-Nagel. 200 ml Zellkultur wurden 2 min bei 15000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die restlichen Schritte erfolgten nach der Anleitung des Herstellers für 'high-copy' Plasmide. Die DNA wurde am Ende in 50 µl Millipore Typ I Wasser aufgenommen.

## **B.2.8 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren**

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration in den Plasmidaufreinigungen wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm gemessen. Eine Extinktion von 1 entspricht dem Gehalt von 50  $\mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger DNA. Mit Hilfe der Formel nach Lambert-Beer konnte eine Konzentrationsbestimmung erfolgen:

$$[\text{DNA}] (\mu\text{g/ml}) = \Delta E_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Um den Verunreinigungsgrad der Lösungen zu ermitteln, wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 280$  nm gemessen. Hier erfolgt die Absorption der aromatischen Aminosäuren von Proteinen. Der Quotient  $E_{260} / E_{280}$  sollte zwischen 1,8 und 2 liegen.

## **B.3 Zellbiologische Methoden**

### **B.3.1 Organotypische Schnittkulturen**

Zur Untersuchung des axonales Auswachsens wurden zwei klassische neurobiologische Kulturmodelle verwendet. Zum einen das Modell von organotypischen Schnittkulturen nach Stoppini et al. (1991) und zum anderen das erweiterte Ko-Kultur-Modell nach Glumm et al. (2002), in dem ein Wildtyp-Hippokampus einer C57BL/6 Maus mit einem entorhinalen Kortex (EC) einer GFP-exprimierenden Maus ko-kultiviert wird.

#### **B.3.1.1 Kollagenkulturen**

Die Präparation von entorhinalen Schnittkulturen, die in Kollagen eingebettet wurden, erfolgte in Anlehnung an die Beschreibungen von Stoppini et al. (1991). Mäuse am postnatalen Tag 0 – 1 (P0 – P1) wurden dekapitiert, die Gehirne unter sterilen Bedingungen entnommen und in kaltes MEM-Medium überführt. Die Hemisphären wurden vom Frontalhirn und vom Cerebellum getrennt und von den Hirnhäuten befreit. Es folgte das Herauspräparieren des Hippokampus mit anhängendem EC. Mit zwei Spateln wurde diese Formation vorsichtig auf die Unterlegscheibe eines McIlwain-Gewebeschneiders gelegt und in 350  $\mu\text{m}$  dicke Scheiben geschnitten. In einer Petrischale mit frischem MEM-Medium wurde

der intakte EC mit einem Skalpell von dem Hippokampus getrennt und mit zwei Spateln in einen vorbereiteten Kollagentropfen (pH 7,4) auf einem Superfrost Objektträger gelegt und vorsichtig angedrückt. Nach 20 min war der Kollagentropfen fest genug, um die Kulturen mit Inkubationsmedium überschichten zu können. Die Inkubation erfolgte für 2 Tage bei 37°C im Brutschrank.

### **B.3.1.2 Ko-Kulturen**

Die Präparation erfolgte wie in B.3.1.1 beschrieben. Nach Trennung des EC vom Hippokampus wurde von Wildtypmäusen der Hippokampus mit zwei Spateln aufgenommen und auf die Membran eines Zellkultureinsatzes gelegt. An diesen Hippokampus wurde der EC einer EGFP-exprimierenden Maus angelegt und für 3 Tage ko-kultiviert. Unter die Zellkultureinsätze wurde 1,2 ml Inkubationsmedium gegeben, welches nach 24 h gewechselt wurde.

### **B.3.2 Präparation primärer Neurone aus dem Hippokampus embryonaler Mäuse**

Als Vorbereitung für die Präparation wurden Deckgläschen mit einem Durchmesser von 20 mm in einer großen Petrischale aus Glas zweimal in Millipore Typ I Wasser und 1 Stunde in 70 %igem Ethanol gewaschen. Die Lagerung erfolgte in 100 %igem Ethanol.

Einen Abend vor der Präparation wurden die Deckgläschen abgeflammt, in eine 12-Well-Platte gesetzt und mit PLL beschichtet. Die Platten wurden kurz vor Versuchsbeginn zweimal mit Millipore Typ I Wasser gewaschen und pro Well 1 ml Präparationsmedium vorgelegt.

Die Muttertiere wurden durch zervikale Dislokation getötet und der Uterus mit den Embryonen im Alter von 18 Tagen (Embryonaltag 18, E18) in eine Petrischale auf Eis überführt. Bei den PRG-1 KO Mäusen wurde jeder Embryo einzeln präpariert, da der Genotyp erst per PCR bestimmt werden musste. Die Hippokampi beider Hemisphären wurden von den Hirnhäuten befreit und in 3 ml HBSS überführt. Nach zweimaligem Waschen wurden 50 µl Trypsin (2,5 %) in 2 ml HBSS zugegeben und 14 min bei 37°C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde das HBSS durch 2,5 ml Präparationsmedium (enthält Pferdeserum) ersetzt. Anschließend wurden die Zellen mit einer abgerundeten und polierten Pasteurpipette vereinzelt. Nach Absetzen der größeren Gewebeteile wurde der Überstand

vorsichtig in ein neues Zellkulturröhrchen überführt und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt:

Zellen / ml = Zellzahl eines Großquadrates x Verdünnungsfaktor x Kammerkonstante $10^4$ .

In einer 12-Well-Platte wurden je nach Gebrauch zwischen  $1,2 \times 10^5$  und  $1,5 \times 10^5$  Zellen pro Well ausgesät. Nach 3 Stunden Inkubation wurde nach zweimaligem Waschen mit 0,1 M PBS das Präparationsmedium gegen das Wachstumsmedium ausgetauscht.

### **B.3.3 Kultivierung und Passagieren von HEK293-Zellen**

Die HEK293-Zelllinie wurde in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in DMEM-Medium mit 10% FCS gehalten. Bei Erreichen einer Konfluenz von 70 % wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das HEK293-Zellmedium und 0,1 M PBS auf 37°C vorgewärmt und die Zentrifuge auf 4°C runtergekühlt. Das alte Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Nach Zugabe von 5 ml neuem Medium wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und in ein 15 ml Zellkulturröhrchen überführt. Der Zellflaschenboden wurde mit 5 ml Medium nachgespült. Nach Zentrifugation der Zellsuspension für 2 min bei 2000 g bei 4°C wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert und mit weiteren 4 ml Medium aufgefüllt. 1 ml dieser neuen Suspension wurde in die Zellkulturflasche gegeben, in die vorher 20 ml Medium vorgelegt wurde.

Die Zelllinie und primäre Neurone wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und hoher Luftfeuchtigkeit gehalten.

### **B.3.4 CaCl<sub>2</sub>-Transfektion**

In einem Gemisch aus Calciumchlorid und Natriumphosphat bindet sich die zu übertragende DNA an ausfallendes Calciumphosphat. Die ausgefallenen Komplexe werden der Zellkultur zugegeben und von den Zellen aufgenommen.

Für eine transiente CaCl<sub>2</sub>-Transfektion wurden die HEK293-Zellen wie oben beschrieben behandelt. Anstatt 1 ml der gewaschenen Zellsuspension in 20 ml neues Medium zu geben, wurde die Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer bestimmt und  $7,5 \times 10^4$  Zellen in eine 12-Well-Platte ausgesät. Auch hier wurden 3 bis 4 Stunden vor Versuchsbeginn Deckplättchen abgeflammt und mit PLL beschichtet (s. B.3.2). Die Transfektion erfolgte am nächsten Tag.

**Tab. 10: Einfacher Transfektionsansatz, CaCl<sub>2</sub>**

| Komponente              | Menge    |
|-------------------------|----------|
| Millipore Typ II Wasser | 33,75 µl |
| Plasmid-DNA (1 µg/µl)   | 1,5 µl   |
| CaCl <sub>2</sub> (2 M) | 3,75 µl  |
| HEPES Puffer (pH 7,15)  | 33,75 µl |

Die Zugabe des HEPES-Puffers erfolgte tröpfchenweise. Der Ansatz wurde für 30 min bei RT inkubiert.

Die HEK293-Zellen wurden mit PBS gewaschen und 1 ml neues Medium zugegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit folgte die Zugabe des Transfektionsansatzes (72,75 µL pro Well). Die Inkubation der Zellen mit dem Transfektionsansatz erfolgte über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Zellen fixiert und für eine immunhistologische Färbung verwendet.

### B.3.5 Transfektion mit Effectene

Zum Einbringen von Plasmid-DNA in primäre Neurone wurde mit dem nicht-liposomalen Effectene Transfektionsreagenz gearbeitet. Durch die Zugabe eines Enhancers wird die DNA kondensiert und anschließend durch das Effectene Reagenz zu kationischen Komplexen geformt, die von der Zelle aufgenommen werden.

Die Transfektion der primären Neurone erfolgte nach 8 Tagen *in vitro* (DIV 8).

**Tab. 11: Einfacher Transfektionsansatz , Effectene**

| Komponente                     | Menge  |
|--------------------------------|--------|
| Puffer EC                      | 75 µl  |
| Plasmid-DNA (1 µg/µl)          | 0,6 µl |
| Enhancer                       | 5 µl   |
| Mischen, Inkubation 5 min, RT  |        |
| Effectene                      | 5 µl   |
| Mischen, Inkubation 10 min, RT |        |
| Wachstumsmedium                | 200 µl |

Der Transfektionsansatz wurde zu den Zellen gegeben, die vorher mit 0,1 M PBS gewaschen und mit 1 ml frischem Wachstumsmedium versorgt wurden. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurden die Zellen erneut mit 0,1 M PBS gewaschen und

mit 1 ml Medium versorgt. Nach 6 Tagen wurden die Zellen fixiert und immunhistologisch weiterverarbeitet (s. 4.6).

### **B.3.6 Immunhistologie**

#### **B.3.6.1 Direkte Methode**

Die Zellen wurden nach der gewünschten Inkubationszeit im Brutschrank einmal mit kaltem PBS gewaschen und dann 20 min mit kaltem 4 %igem PFA fixiert. Die Blockierung von unspezifischen Bindungen erfolgte mit 10 % FCS in 0,1 M PB für 40 min. Anschließend wurde die Zellmembran mit 0,1 % TritonX-100 in Blocklösung permeabilisiert (5 min, RT). Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte entweder über Nacht bei 4°C oder für 2 Stunden bei RT. Die Zellen wurden dreimal mit 0,1 M PB gewaschen und dann mit dem korrespondierenden sekundären Antikörper für 2 Stunden bei RT inkubiert. Für eine Doppelfärbung wurden primäre Antikörper aus verschiedenen Spezies benutzt. Nach dreimaligem Waschen mit 0,1 M PB wurden die Deckplättchen final noch mal mit Wasser gespült, um die Salzreste des Puffers abzuwaschen. Die Deckplättchen mit den Zellen wurden mit Glycerolgelatine auf einem Objektträger eingebettet.

Das F-Aktin von HEK293-Zellen wurde mit Phalloidin angefärbt, das direkt an ein Fluorochrom gekoppelt war. Es wurde nach Permeabilisierung auf die Zellen gegeben und nach 40 min dreimal mit 0,1 M PB abgewaschen.

#### **B.3.6.2 Indirekte Methode**

Fixierung, Blockierung und Inkubation mit den Antikörpern erfolgten zu B.3.6.1 analog. Allerdings wurde hier mit einem biotinyliertem sekundären Antikörper gearbeitet, der mit Hilfe des Vectastain ABC Kits sichtbar gemacht wurde. Dazu wurden 5 µl der Lösung A unter Rühren in 1 ml 0,1 M PB gegeben und anschließend mit 5 µl Lösung B gemischt. Die Gesamtlösung wurde 45 min im Dunkeln auf dem Schüttler inkubiert. Dieser Schritt erlaubte die Bildung von stabilen Avidin/Peroxidase-Komplexen. Die Zellen wurden 1,5 Stunden mit dieser ABC-Lösung bei RT inkubiert, was wiederum die Bindung des Avidins an das Biotin des sekundären Antikörpers erlaubte. Nach dreimaligem Waschen mit 0,1 M PB wurde DAB als Peroxidase-Substrat auf die Zellen gegeben. DAB wird von dem Enzym oxidiert und

bildet ein unlösliches Präzipitat brauner Farbe, das im normalen Durchlicht detektiert werden kann und nicht ausbleicht. Für 25 ml Lösung wurden 17,5 mg DAB benötigt. Das Pulver wurde in 0,1 M PB unter Rühren gelöst und für 1 min ins Ultraschallbad gestellt. Vor dem Gebrauch wurde die Lösung noch mal filtriert. Pro 10 ml Ansatz wurden 100 µl 1 %iges  $\text{CoCl}_2$  und 80 µl 1 %iges Ni tropfenweise dazugegeben. Zur Blockierung endogener Peroxidaseaktivität wurden außerdem noch 33,3 µl 0,3 %iges  $\text{H}_2\text{O}_2$  zugegeben. Es wurde mit 500 µl Lösung pro Well gerechnet. Nach 2 – 5 min wurde die Reaktion durch dreimaliges Waschen mit 0,1 M PB gestoppt. Die Objektträger mit den Zellen wurden mit Entellan eingedeckelt.

### **B.3.7 Transkardiale Perfusion**

Für *in vivo* Untersuchungen der Spinemorphologie wurden PRG-1 KO Mäuse mit Tieren der Thy-1.2-EGFP\_L21 Linie verpaart. Die Tiere wurden im Alter von P12, P19 oder  $\geq 6$  Wochen (adult) perfundiert. Dazu wurden die Tiere mit 0,5 – 1 ml / 20 – 25 g Körpergewicht Ketamincocktail betäubt. Der Bauchraum und der Thorax wurden geöffnet und das Herz freigelegt. Mit Hilfe eines Katheters wurden etwa 10 ml Tyrode (je nach Tiergröße) langsam in die linke Herzkammer gepumpt. Durch einen kleinen Schnitt in den rechten Vorhof konnte so das Blut aus dem Organismus rausgespült werden. Sobald die Spüllösung klar war, erfolgte ein Wechsel zu 4 %igem PFA. Die Fixierung des Tieres trat nach etwa 20 ml Fixativ ein. Die Maus wurde dekapitiert, das Gehirn entnommen und für 2 Tage bei 4°C in PFA gelagert. Danach erfolgte eine Lagerung in 0,1 M PB bei 4°C bis zur Weiterverwendung.

### **B.3.8 Anfertigung von Gewebeschnitten**

Von den fixierten Gehirnen wurde mit Hilfe eines Vibratoms 50 µm dicke coronale Schnitte im Bereich des Hippokampus angefertigt. Die Gehirne wurden einzeln mit Histoacryl-Gewebekleber auf der Halterung des Vibratoms befestigt und in einer Wanne mit kaltem 0,1 M PB geschnitten und aufgefangen. Die Schnitte wurden in Wasser auf Objektträger aufgezogen und nach dem Trocknen an der Luft mit Immo-Mount eingedeckelt. Das endogene EGFP Signal der Tiere war stark genug, dass auf eine immunhistologische Färbung verzichtet werden konnte.

### **B.3.9 Vitalitäts-Nachweis mit Propidiumjodid**

Propidiumjodid (PI) dringt nur durch perforierte Membranen von toten Zellen ein und interkaliert mit der DNA. Diese Zellen leuchten dann im Fluoreszenzlicht rot.

Die zu untersuchenden Kulturen wurden für 5 min in 2 ml PB und 2 µl PI Stocklösung inkubiert und anschließend sofort mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop (s. 3.10.1) fotografiert.

### **B.3.10 Mikroskopie**

#### **B.3.10.1 Inverse Mikroskopie**

Die inverse Mikroskopie mit Durchlicht wurde zum einen zur Untersuchung der Dendritenkomplexität in primären Neuronen verwendet und zum anderen zur Ablichtung der Kollagen Kulturen zur Bestimmung der Dichte ausgewachsener Axone.

Die primären Neurone wurden mit einem 20x Objektiv (Olympus LUCPLFLN, 0.45 Ph1) an einem Olympus IX81 abgelichtet.

Die entorhinalen Kollagenkulturen wurden mit einem 10x Objektiv (Olympus UplanFL, 0.3 Ph1) an einem Olympus IX70 abfotografiert. Die Kulturen wurden so platziert, dass der Rand der Kultur gerade am oberen oder unteren Rand des Bildes zu sehen war.

Die Ko-Kulturen, die zur Vitalitätskontrolle mit Propidiumjodid angefärbt wurden (s. 3.9), wurden ebenfalls mit dem IX70 fotografiert, allerdings angeregt mit grünem Fluoreszenzlicht und einem 2.5x Objektiv (Olympus Plan-NEOFLUAR, 0.075).

Alle Auswertungen erfolgten mit der Software Image J.

#### **B.3.10.2 Fluoreszenzmikroskopie**

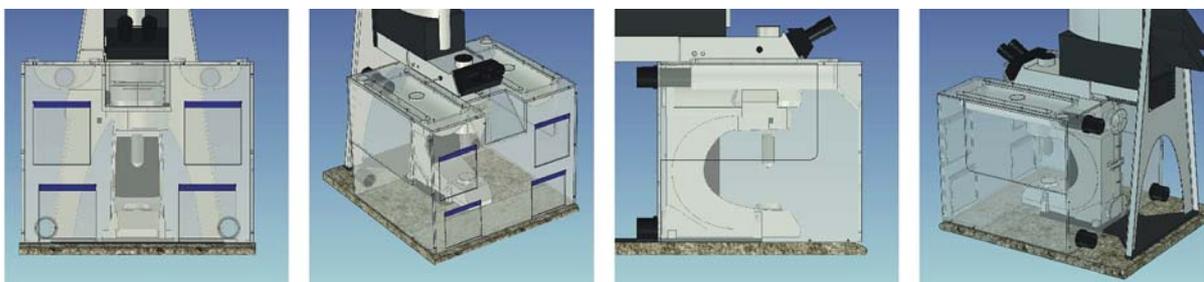
Für die Messung von statischen Auswuchsprozessen wurden  $\beta$ \_aktin\_EGFP entorhinal-hippokampale Ko-Kulturen mit einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus, BX 50) abfotografiert. Die Bilder wurden mit einem 4x Objektiv (Olympus UplanFL 0,13 NA) und der Filtereinstellung für blaues Licht (WIB) gemacht. Die Auswertung erfolgte mit der Software Image J.

### B.3.10.3 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Zur Analyse der Spinemorphologie wurden Bilder von fixierten fluoreszierenden Zellen und Gehirnschnitten mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (SL) aufgenommen, wobei folgende Laser verwendet wurden: Argon-Laser (Anregung 488 nm) und Helium-Neon-Laser (Anregung 543 nm und 633 nm). Von den Neuronen wurde zuerst ein Übersichtsbild der ganzen Zelle mit dem 40x Öl-Objektiv gemacht. Für eine vergrößerte Aufnahme der einzelnen Spines wurde das 63x Öl-Objektiv verwendet, wobei noch zusätzlich mit einem 4x Zoom gearbeitet wurde. Die Aufnahmen wurden mit der Leica Confocal Software (© 1997 – 2004) als Bilderstapel mit einer Schrittweite von 0,2  $\mu\text{m}$ , einem 'line average' von 4 und einer 1024x1024 Auflösung gemacht.

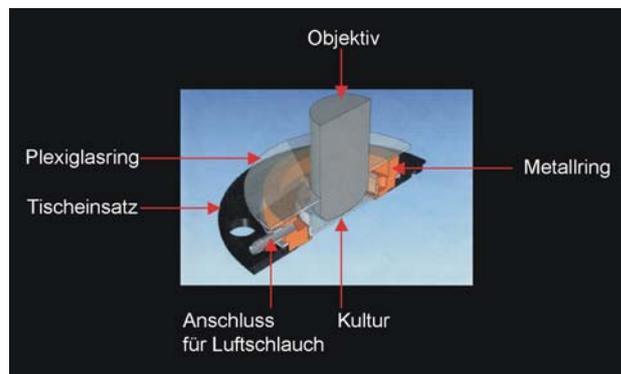
### B.3.10.4 2-Photonen-Mikroskopie, Life-imaging

Für die Messung von dynamischen Auswuchsprozessen wurde ebenfalls ein konfokales Fluoreszenzmikroskop (SP2) verwendet, wobei hier mit einem gepulsten Titan:Sapphire-Laser gearbeitet wurde. Um den Objektisch, den Fuß des Mikroskops, den Tubusträger und das Objektiv wurde eine abgedunkelte Kammer aus Plexiglas errichtet (life imaging services, Basel), die mit einem Beheizungssystem verbunden war. Außerdem konnte der normalen Umgebungsluft durch einen Luftmischer 5 %  $\text{CO}_2$  zugefügt werden. Diese angereicherte Luft wurde durch eine Wassersäule geführt, wodurch die Luft angefeuchtet bei der zu untersuchenden Kultur ankam. Die Kammer wurde mindestens 6 Stunden vor Beginn der Messung auf 37°C vorgeheizt. Durch die Temperatur, das  $\text{CO}_2$  und die Luftfeuchte wurden annähernd die Umgebungsbedingungen eines Brutschrankes geschaffen (Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Die in dieser Arbeit durchgeführten Beobachtungen der dynamischen Auswuchsprozesse wurden an einem beheizbaren Mikroskop durchgeführt. Dazu wurde um das konfokale Mikroskop SP2 eine verdunkelte Kammer aus Plexiglas errichtet, die mit  $\text{CO}_2$  angereicherter und 37°C warmer Luft durchströmt wurde.

Die Membran mit einer entorhinalen-hippokampalen Ko-Kultur wurde auf ein mit Ethanol gereinigtes Deckglas mit einem Durchmesser von 40 mm gesetzt. Dieses Deckglas wurde in den dafür vorgesehenen Einsatz des Mikroskoptisches gelegt und die Membran mit einem dichten Metallring fixiert. Auf die Kultur wurden 2 ml vorgewärmtes frisches Inkubationsmedium gegeben. Durch einen Plexiglasring, der gerade eine Öffnung für das Objektiv hatte, konnte um die Kultur selber noch mal ein nahezu abgeschlossenes System geschaffen werden. An den Seiten dieses Tischeinsatzes waren zwei Öffnungen, an die man die Schläuche für die angefeuchtete Luft der Kammer anschließen konnte (Abbildung 10).



**Abbildung 12: Einsatz des Mikroskoptisches.** Durch den Metallring, das Objektiv und einen Plexiglasring konnte über der zu messenden Kultur ein nahezu geschlossenes System geschaffen werden, in dem das Medium mit 5 % CO<sub>2</sub> begast werden konnte.

Die Aufnahmen wurden mit einem 20x Wasserobjektiv (Olympus XLUMPlanFL 0,95 NA) durchgeführt. Die anregende Wellenlänge betrug 900 nm, was einer vollen Laserleistung von 1130 mW entsprach. Die Stärke des Lasers wurde auf 6 % bzw. 12,5 % runterreguliert, da eine höhere Laserstärke die Kultur schädigen würde. Die Kultur wurde so platziert, dass der Perforant Path (PP) des EC in der äußeren Molekularschicht des Hippokampus eindeutig zu sehen war. Mit einer Vergrößerung von 1,7 – 2 wurden einzelne Wachstumskegel hervorgehoben und mit der Zeit verfolgt. Die restlichen Einstellungen sahen wie folgt aus:

**Tab. 12: Mikroskop-Einstellungen beim life-imaging.** Leica Confocal Software (© 1997 – 2004)

|                            |                                    |
|----------------------------|------------------------------------|
| Verstärker des Detektors   | 750 Volt                           |
| Auflösung                  | 512 x 512                          |
| Line average               | 1                                  |
| Geschwindigkeit Scanner    | 800 Hz                             |
| Beam expander              | 1                                  |
| Bilderstapel               | Maximal 30 Bilder pro Zeitaufnahme |
| Schrittweite               | 0,8 – 1 $\mu\text{m}$              |
| Zeitintervall              | 10 – 20 min                        |
| Durchschnittliche Messzeit | 3 Std                              |

### B.3.11 Statistische Verfahren

Für die statistische Auswertung aller in dieser Arbeit erhobenen Daten wurden die jeweiligen Mittelwerte gebildet und der Standardfehler der Datenreihen errechnet. Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe der Software GraphPad Prism 4 (San Diego, CA, USA).

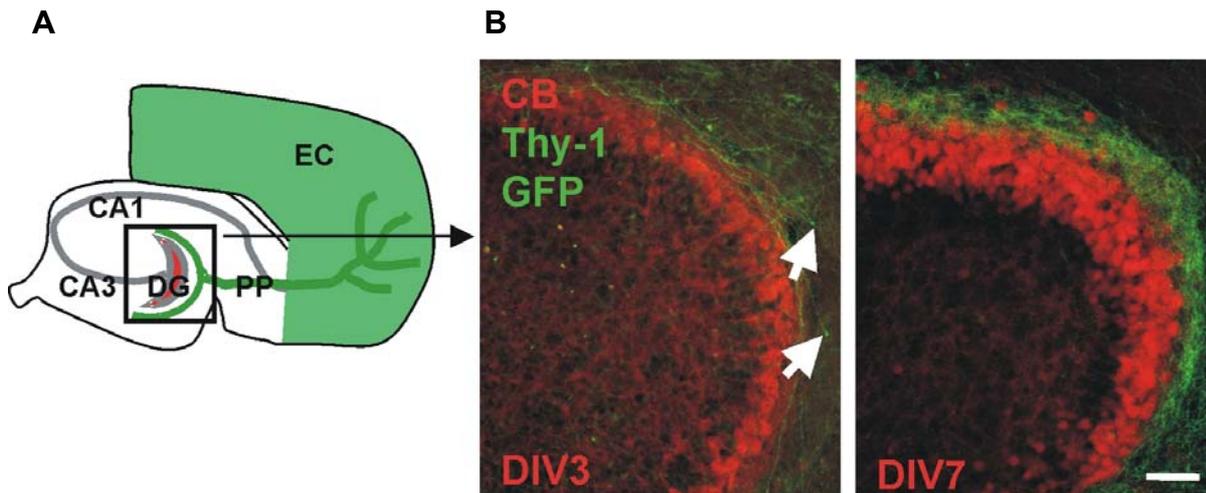
Außerdem wurden die in den Experimenten gewonnenen Daten auf ihre statistische Signifikanz geprüft. Dieser Wert gibt an, wie groß die Wahrscheinlichkeit ( $p$ ) ist, dass der mittlere Wert einer Messreihe von einem angenommenen Wert abweicht, das heißt, ob die Hypothese, die Abweichung sei rein zufällig, zurückgewiesen werden kann. Dies erfolgte zum Vergleich von zwei Gruppen mit dem Student's t-test für unabhängige Stichproben und ungleicher Standardabweichung. Bei mehreren zu vergleichenden Gruppen wurde eine one-way ANOVA mit Bonferroni Korrektur angewandt. Die Signifikanzniveaus wurden auf 0,05 (\*), 0,01 (\*\*) und 0,001 (\*\*\*) festgelegt. Ein Signifikanzniveau von 0,05 bedeutet, dass ein Ergebnis als signifikant akzeptiert wird, welches rein zufällig nur in 5 % aller Stichprobenziehungen auftreten würde, wenn der vermutete Zusammenhang "in Wahrheit", d. h. in der Grundgesamtheit, gar nicht besteht.

## C Ergebnisse

### C.1 Axonale Auswachsanalysen PRG-1 defizienter Mäuse

Organotypische Schnittkulturen des Hippokampus eignen sich aufgrund der relativ einfachen Organisation hervorragend, um die Differenzierung von Neuronen und die Mechanismen axonaler Wegfindung zu untersuchen. Die charakteristischen Schichten von Zellen und Dendriten in diesen Schnitten bleiben gut erhalten und die Axone wachsen in ihre korrekte Zielregion ein (Gahwiler, 1981, 1984). Das Kultur-Modell entspricht demnach weitgehend der *in vivo* Situation.

Entorhinale-hippokampale Ko-Kulturen von unreifem Gehirngewebe sind ein weit verbreitetes Modellsystem, um das Auswachsen der entorhinalen Axone in den Hippokampus zu visualisieren und zu untersuchen. Durch die Kombination von einem entorhinalen Kortex (EC) aus einer EGFP-exprimierenden Maus und einem Hippokampus aus einer Wildtyp Maus sind die grün markierten Axone des ECs in dem nicht-fluoreszierenden Hippokampus als Hintergrund leicht zu detektieren. In Abbildung 11 A wird das Ko-Kultur-Modell schematisch dargestellt. Axone aus dem EC wachsen als Perforant Path (PP) in die äußere Molekularschicht des Gyrus Dentatus (DG). Abbildung 11 B zeigt den Wildtyp DG aus einer Ko-Kultur mit einem EC aus der Mauslinie Thy-1.2-EGFP\_L17 nach 3 und 7 Tagen Inkubation (DIV3 & 7). Die Körnerzellen des DG wurden hier mit einer roten Calbindinfärbung sichtbar gemacht. In der Molekularschicht des DG war deutlich das grüne Axonband des PP zu erkennen. In den jüngeren Kulturen (DIV3) waren einzelne Axone mit ihren Wachstumskegeln auszumachen.



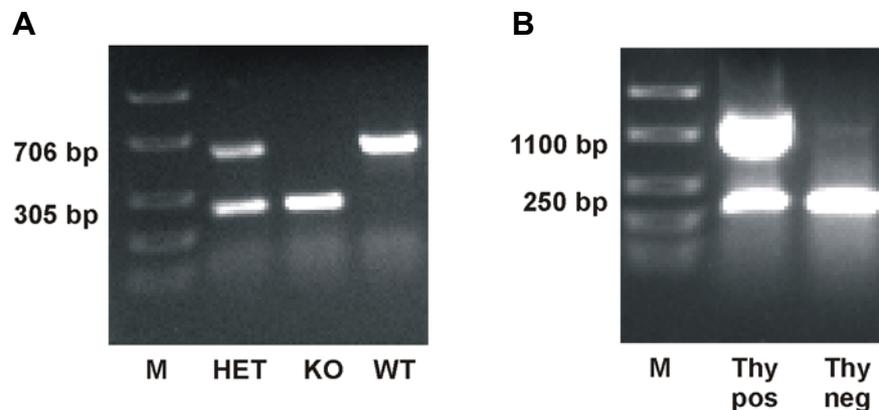
**Abbildung 11: Entorhinale-hippokampale Ko-Kulturen aus EGFP-exprimierenden und Wildtyp Mäusen.** **A)** Schematische Darstellung des verwendeten Ko-Kultur-Modells. Durch die Kombination eines entorhinalen Kortex (EC) einer EGFP-exprimierenden Maus mit einem Hippokampus einer Wildtyp Maus können die grün markierten Axone, die aus Schicht II/III des ECs in den Gyrus Dentatus (DG) einwachsen, auf dem nicht-leuchtenden Hintergrund des Hippokampus eindeutig identifiziert werden. **B)** Vergrößerung des DG. Die Körnerzellen wurden durch einen Calbindin Antikörper rot angefärbt. Die fluoreszierenden Axone aus dem EC wanderten in die äußere Molekularschicht und waren als grünes Faserband zu erkennen. Die weißen Pfeile in der jüngeren Kultur (DIV3) markieren einzelne Wachstumskegel. Skala = 50  $\mu\text{m}$ .

Ein solches Ko-Kultur-Modell wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet, um die Rolle von PRG-1 beim Auswachsen von Axonen zu untersuchen.

Bräuer et al. zeigten mit Hilfe einer immunologischen Färbung in Hirnschnitten adulter Ratten, dass die äußere Molekularschicht keine PRG-1 positiven Fasern aufweist. Nach einer entorhinalen Kortextläsion allerdings wird die PRG-1 Expression hochreguliert und 5 Tage nach Läsion waren deutlich PRG-1 positive Fasern in der gleichen Hirnregion zu erkennen (Bräuer et al., 2003). Die Tatsache, dass PRG-1 zu einem Zeitpunkt hochreguliert wird, in dem Axone regenerativ neu auswachsen und der Beginn der mRNA Expression von PRG-1 parallel zu der Entwicklung von Netzwerken ab dem Embryonaltag 19 (E19) lässt möglich erscheinen, dass dieses Molekül an der axonalen Wegfindung beteiligt ist.

Das Fehlen des interessierenden Proteins kann Aufschluss darüber geben, welche Bedeutung es für ein System hat. Um mit Hilfe des in diesem Abschnitt vorgestellten Ko-Kultur-Modells den Einfluss von PRG-1 auf das Auswachsverhalten definierter Fasern während der Entwicklung analysieren zu können, wurden PRG-1 KO Mäuse mit EGFP exprimierenden Mäusen gekreuzt. Für diese Verpaarungen wurden die Linien  $\beta$ \_aktin\_EGFP bzw. Thy-1.2-EGFP\_L17 verwendet. PRG-1<sup>+/-</sup> Tiere wurden mit EGFP positiven Tieren verpaart. Als Nachkommen erhaltene Tiere mit beiden Allelen wurden wiederum verpaart. Die nächste Nachkommenschaft enthielt nach Mendel grün-fluoreszierende PRG-1<sup>-/-</sup>, PRG-1<sup>+/-</sup> und PRG-1<sup>+/+</sup> Tiere und nicht-fluoreszierende PRG-1<sup>-/-</sup>, PRG-1<sup>+/-</sup> und PRG-1<sup>+/+</sup> Tiere. Für

die Untersuchungen wurden homozygoten Nachkommen verwendet. Die Bestimmung des jeweiligen Genotyps erfolgte wie unter 2.1 bis 2.4 beschrieben. Abbildung 12 zeigt die jeweiligen PCR Ergebnisse.



**Abbildung 12 :** *PCR zur Genotypisierung der in dieser Arbeit verwendeten gentechnisch veränderten Tiere. A) PRG1 KO PCR. Die Wildtyp Bande (WT) wurde auf einer Höhe von 706 bp detektiert, die PRG-1 KO Bande (KO) bei 305 bp. Ein heterozygoten Tier (Het) wies beide Banden auf. B) Thy-1-EGFP PCR. Die Wildtyp Bande war auf einer Höhe von 250 bp zu detektieren. Ein positives Tier für Thy-EGFP hatte bei 1100 bp eine zusätzliche Bande.*

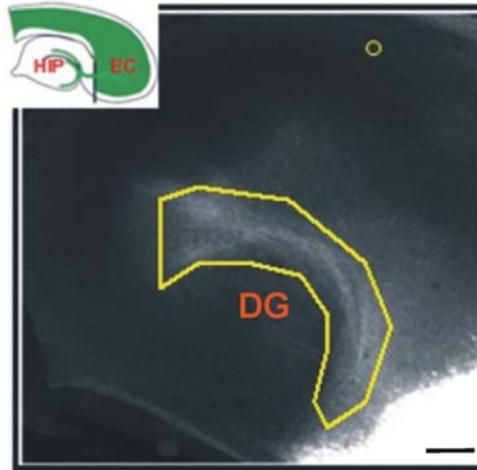
### C.1.1 PRG-1 defiziente Mäuse zeigen ein geringeres Einwachsen von entorhinalen Fasern in den Hippokampus

Der Grad des axonalen Einwachsens wurde bestimmt, indem die Intensität der grün-fluoreszierenden Fläche in der Molekularschicht des DG gemessen wurde. Je höher die Fluoreszenzintensität, umso besser und zahlreicher waren die Fasern aus dem EC in den Hippokampus eingewachsen. Für diese statische Auswachsanalyse wurden die Kreuzungen mit  $\beta$ \_aktin\_EGFP Mäusen verwendet, da diese Linie EGFP in jeder Körperzelle und in deren Fortsätze exprimiert. Das Axonband in Ko-Kulturen mit ECs aus diesen Tieren war eindeutig zu erkennen und ließ sich gut analysieren.

Für die in dieser Arbeit zu untersuchenden Fragestellung wurden Tiere am Tag ihrer Geburt bzw. innerhalb der ersten 24 Stunden für die Präparation der Ko-Kulturen verwendet (P0/P1). Nach DIV3 wurden die Schnitte mit 4 % PFA fixiert, anschließend mit einer Pufferlösung gewaschen und unbehandelt auf einen Objektträger aufgezogen und eingedeckelt.

Zur Quantifizierung wurden alle Kulturen mit der gleichen Belichtungszeit fotografiert und die erhaltenen Bilder mit der Software Image J ausgewertet. Das Programm ermittelte

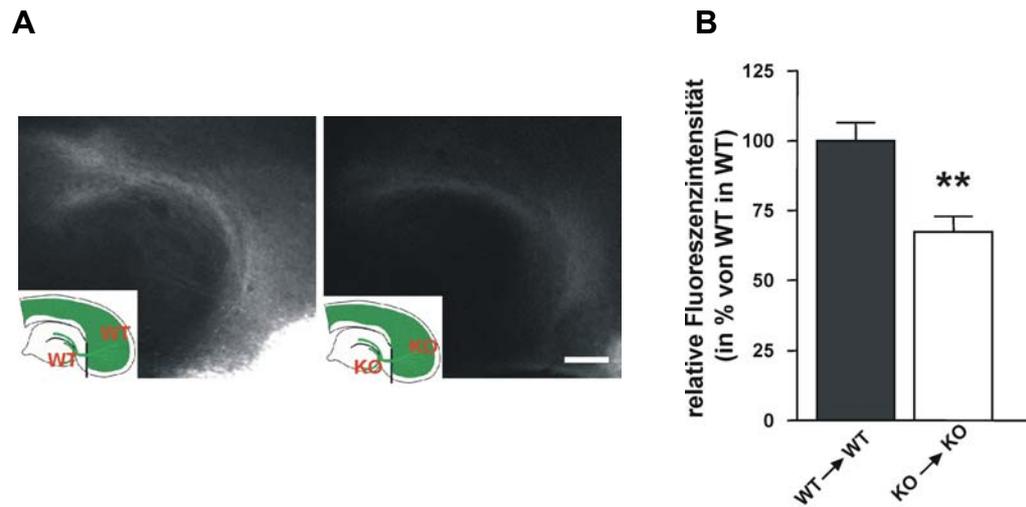
automatisch den durchschnittlichen Fluoreszenzwert des innervierten DG als definierte Region ( $1 \times 10^5 \mu\text{m}^2 \pm 5\%$ ). Abbildung 13 zeigt beispielhaft eine solche Aufnahme.



**Abbildung 13:** *Die Quantifizierung der relativen Fluoreszenzintensität dient der Ermittlung des Grades der innervierten Fasern. Zur Auswertung wurde der Bereich des Gyrus Dentatus (DG) eingegrenzt, der von Axonen aus dem entorhinalen Kortex (EC) innerviert war. Um die Autofluoreszenz des Gewebes aus den Messungen auszuschließen, wurde im Hippokampus ein Blindwert bestimmt und von den Messdaten subtrahiert (Kreis oben rechts im Bild). Oben links ist schematisch die Hippokampus-Formation dargestellt, die der Orientierung dienen soll. Skala = 100  $\mu\text{m}$*

Es wurden zuerst Ko-Kulturen angefertigt, denen PRG-1 im Hippokampus und im EC fehlten. Parallel dazu wurden Wildtyp Kulturen als Kontrolle angefertigt, die in ihrem Hippokampus und im EC PRG-1 exprimierten. Der Einfachheit halber werden im Folgenden die Kulturen so benannt, dass zuerst der Genotyp des ECs und dann der Genotyp des Hippokampus genannt wird, verbunden durch einen Pfeil, der die Auswachsrichtung verdeutlichen soll, also WT→WT bzw. KO→KO.

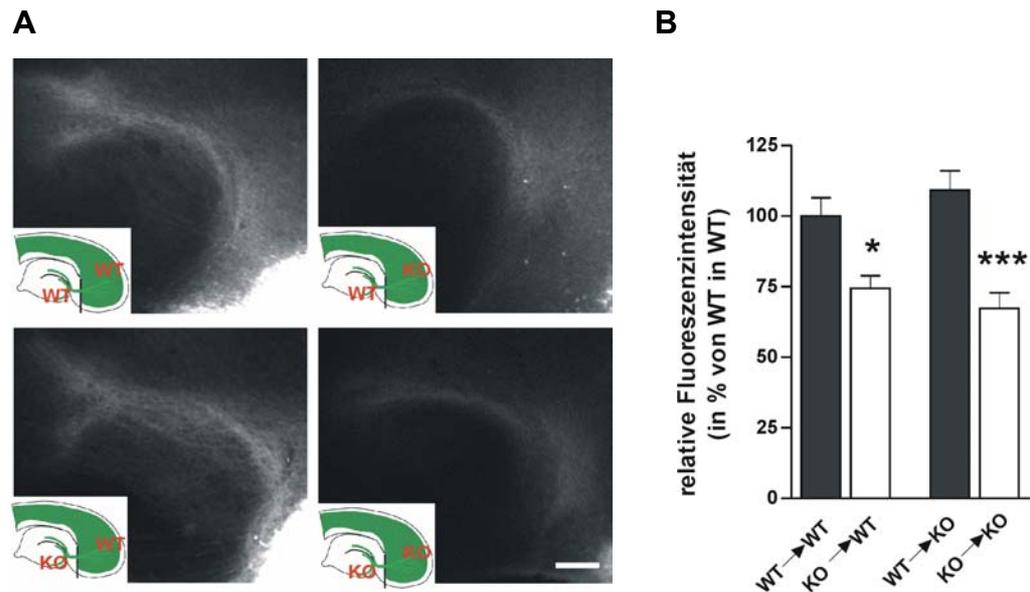
In Abbildung 14 A ist links WT→WT und rechts KO→KO dargestellt. Es ist zu erkennen, dass in der Kultur ohne PRG-1 das Axonband wesentlich schwächer fluoreszierte als in der Kultur mit PRG-1. Die quantitative Analyse (Abbildung 14 B) der Fluoreszenzintensitäten bestätigte diese Beobachtung. Der Wert der Wildtyp Kulturen wurde gleich 100 % gesetzt. Bei KO→KO wurde ein Wert ermittelt, der 33 % niedriger war als bei den WT→WT Kontrollen. Die genauen Messwerte sahen wie folgt aus: WT→WT,  $100 \pm 6.28\%$  Fluoreszenz,  $n = 24$ ; KO→KO,  $67.34 \pm 5.23\%$  Fluoreszenz,  $n = 20$ . Der Umfang der Stichprobe,  $n$ , setzt sich zusammen aus der Anzahl der Kulturen, die an mindestens 3 verschiedenen Tagen präpariert wurden.



**Abbildung 14:** Die Quantifizierung der relativen Fluoreszenzintensitäten zeigt, dass in Kulturen, in denen PRG-1 fehlt, weniger Axone einwachsen als in Kontrollkulturen mit PRG-1. **A)** Aufnahmen der Ko-Kulturen mit einem Fluoreszenzmikroskop. Links ist die Kontrolle dargestellt, in der Wildtyp Axone in einen Wildtyp Hippokampus einwachsen (WT→WT), rechts eine KO-Kultur, in der PRG-1 in den Axonen und im Hippokampus fehlt (KO→KO). Die schematischen Zeichnungen jeweils links unten in den Bildern dienen der Orientierung. Skala = 100  $\mu$ m. **B)** Die statistische Analyse der Fluoreszenzintensitäten zeigt, dass in der KO Kultur das axonale Einwachsen um 33 % verringert ist.  $**p < 0.01$ .

Um zu analysieren, ob der beobachtete Effekt am fehlenden PRG-1 in der Zielregion (dem Hippokampus) oder am fehlenden PRG-1 der Ursprungszellen (EC) lag, wurden Mischkulturen angefertigt. Dafür wurde ein Wildtyp Hippokampus mit einem grünen PRG-1 defizienten EC kultiviert (KO→WT) und ein Hippokampus aus einer PRG-1 KO Maus mit einem grünen Wildtyp EC (WT→KO).

Die Untersuchung ergab, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kulturen gab, die PRG-1 im EC, also den Ursprungszellen der Axone, exprimierten (WT→WT,  $100 \pm 6.28$  %,  $n = 24$ ; WT→KO,  $109.08 \pm 6.63$  %,  $n = 15$ ). Auch zwischen den Kulturen, denen PRG-1 im EC fehlten, wurde kein Unterschied festgestellt (KO→KO,  $67.34 \pm 5.23$  %,  $n = 20$ , KO→WT,  $74.34 \pm 4.33$  %,  $n = 17$ ). Beim Vergleich der Kulturen, die sich in ihrem EC unterschieden, aber den gleichen Genotyp im Hippokampus hatten, also WT→WT mit KO→WT und WT→KO mit KO→KO, wurde ein signifikanter Unterschied in den Fluoreszenzintensitäten nachgewiesen. Diese Kulturen sind in Abbildung 15 gegenüber gestellt.



**Abbildung 15:** Die Quantifizierung der relativen Fluoreszenzintensitäten aus allen Kulturen zeigt, dass unabhängig vom Genotyp des Hippokampus die Axone schlechter einwachsen, wenn PRG-1 im EC fehlt. A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen aller Ko-Kulturen. Das fluoreszierende Axonband ist deutlich schwächer, wenn der EC aus einer PRG-1 defizienten Maus stammt, als aus einer Wildtyp Maus. Die schematischen Zeichnungen jeweils links unten in den Bildern dienen der Orientierung. Skala = 100  $\mu$ m. B) Die statistische Analyse bestätigt die schwächere Fluoreszenz der KO → Hip Ko-Kulturen. \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass PRG-1 nur eine Rolle in den Ursprungszellen der Axone zu haben scheint. Das Einwachsen der Fasern in den Hippokampus ist bei der PRG-1 KO Maus durch das Fehlen von PRG-1 gestört. Dies geschieht allerdings unabhängig von der PRG-1 Expression in der Zielregion.

## C.2 Dynamische axonale Auswachsanalysen PRG-1 defizienter Mäuse mit Hilfe von Zeitraffer-Aufnahmen

Die Ausmessung der Hippokampus-Formation bei Wildtypen und PRG-1 KO Gehirnen zeigten keinen Größenunterschied (Daten nicht gezeigt), was darauf schließen ließ, dass das geringere Auswachsen von PRG-1 defizienten Tieren nicht auf eine Verringerung von Zellen zurückzuführen war. Eine weitere Möglichkeit, die zu einem beeinträchtigten Auswachsen führen könnte, ist eine reduzierte Geschwindigkeit der auswachsenden Axone. Diese Möglichkeit wurde im folgenden Abschnitt untersucht.

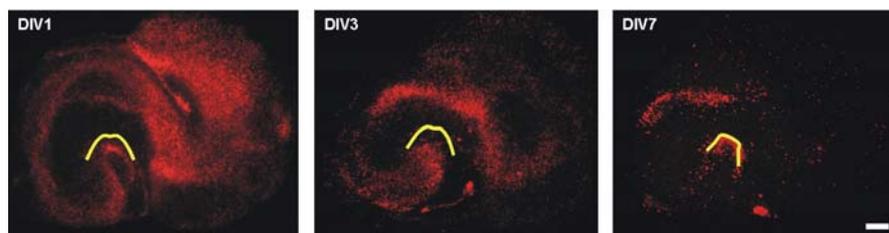
Bewegungen und Veränderungen im sich entwickelnden Nervensystem sind hoch dynamische Prozesse, die in kürzester Zeit ablaufen. Um den eigentlichen Prozess des Auswachsens definierter Axone zu untersuchen, wurde ein konfokales Mikroskop mit einem

2-Photonen-Laser verwendet. Auf diese Weise war es möglich, Zeitraffer-Aufnahmen von lebendem Gewebe anzufertigen ('time lapse life-imaging'; s. auch A.8.2 und B.3.10.4).

### C.2.1 Vitalitätsnachweis

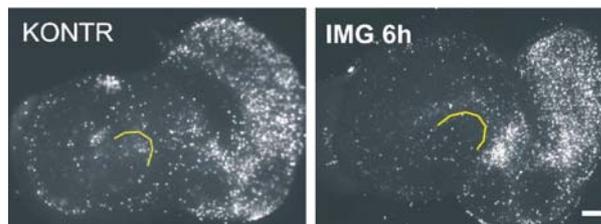
Bei der Etablierung der life-imaging-Methode an Leberkulturen musste ein Zeitfenster gefunden werden, in dem die Kulturen trotz des starken 2-Photonen-Lasers und außerhalb des Brutschrankes überlebten. Dies war nötig, um zu gewährleisten, dass die gemessenen Auswachsgeschwindigkeiten repräsentativ waren und Messungen langsamer Wachstumskegel nicht auf ein Absterben der Kultur zurückzuführen waren. Das Anfärben der Kulturen mit dem Nukleinsäureinterkalator Propidiumiodid (PI) wurde dafür als Vitalitätsnachweis durchgeführt. Dieses stellte eine einfache und schnelle Nachweismethode für tote Zellen dar, da der Farbstoff nur perforierte Zellmembranen von toten Zellen, nicht jedoch die intakte Membran von lebenden Zellen durchdringen kann. Die toten Zellen waren an einer roten Färbung zu erkennen.

Um den Zelltod von Gehirnschnitten zu ermitteln, die *in vitro* gehalten werden, wurden organotypische Kulturen nach DIV1, 3 und 7 ohne weitere Behandlung mit PI inkubiert und mikroskopisch analysiert. Es zeigte sich, dass 1 Tag nach der Präparation der Schnitte ein deutliches rotes Band zu erkennen war, was sich über die Kultur zog. Nach 3 Tagen war die Anzahl der roten toten Zellen deutlich gesunken und nach 7 Tagen waren nur noch vereinzelte Zellen zu sehen. Abbildung 16 zeigt eine solche Analyse.



**Abbildung 16:** Organotypische Kulturen nach 1, 3 und 7 Tagen, angefärbt mit dem Vitalitätsmarker Propidiumiodid. Propidiumiodid (PI) wird beim Färben aus lebenden Zellen ausgeschlossen und kann nur durch die Membran von toten Zellen in den Zellkern eindringen, wo es in die DNA interkaliert. Tote Zellen erscheinen rot. Nach 1 Tag in Kultur (DIV1) waren über die ganze Kultur tote Zellen verteilt. An DIV3 nahm die Anzahl toter Zellen deutlich ab und an DIV7 waren kaum noch tote Zellen auszumachen. Gelber Balken = DG, Skala = 200  $\mu\text{m}$ .

Für die Etablierung der life-imaging-Experimente wurden Kulturen im Alter von DIV3 verwendet, da der Vitalitätsnachweis zeigen konnte, dass die Kulturen sich zu diesem Zeitpunkt von der Präparation erholt hatten. Es sollte nun eine Zeitspanne und eine Stärke des 2-Photonen-Lasers als die Bedingungen ermittelt werden, in denen die Kulturen beim Messen nicht geschädigt werden. Zum Nachweis der Vitalität wurden nach verschiedenen Zeitpunkten und verschiedenen starken Laser-Leistungen die Kulturen aus der life-imaging-Kammer entnommen und parallel mit jeweils einer Kontrolle aus dem Brutschrank mit PI behandelt. Um einen besseren Überblick zu behalten, wurden die einzelnen Werte hier nicht aufgeführt. Abbildung 17 zeigt den Versuch, der ausschlaggebend war für die Wahl von Zeit und Laser-Leistung. Links ist die Kontrollkultur dargestellt, nach 6 Stunden im Brutschrank und rechts eine Kultur, von der in der life-imaging-Anlage in der gleichen Zeit alle 20 min bei einer Laserleistung von 12,5 % ein Bilderstapel aufgenommen wurde. Es lässt sich erkennen, dass es zwischen Kontrolle und abgebildeter Kultur keinen wesentlichen Unterschied im Vitalitätsgrad gab. Basierend auf diesem Ergebnis wurde für das eigentliche Experiment, dem Verfolgen von Wachstumskegeln bei Wildtyp und PRG-1 KO Maus, eine Laser-Leistung zwischen 6 und 12.5 % und, um sicher zu gehen, eine reduzierte Zeitspanne zwischen 3 und 4 Stunden gewählt.



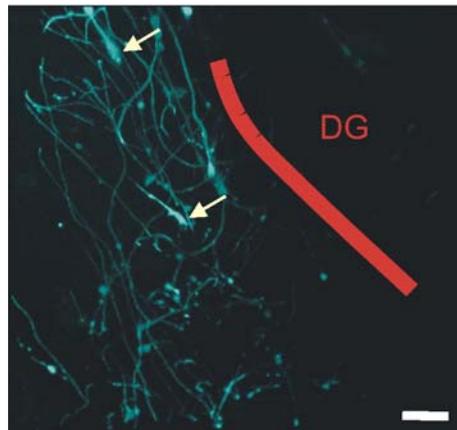
**Abbildung 17:** *Organotypische Kulturen nach 3 Tagen, angefärbt mit dem Vitalitätsmarker Propidiumiodid. Links eine Kontrolle aus dem Brutschrank, rechts eine Kultur, von der an einem auf 37°C beheizten Mikroskop alle 20 min ein Bilderstapel mit 12,5 % Laserleistung gemacht wurde. Die gesamte Aufnahmezeit betrug 6 Stunden. Es war kein wesentlicher Unterschied im Vitalitätsgrad festzustellen. Gelber Balken = DG, Img = imaging (Aufnahme). Skala = 200 µm.*

### C.2.2 Messung der Einwachsgeschwindigkeit von entorhinalen Fasern

Dynamische Prozesse in der neuronalen Entwicklung, wie dem axonalen Wachstum, können quantifiziert werden, indem die Motilität der Axone für ein definiertes Zeitfenster berechnet wird.

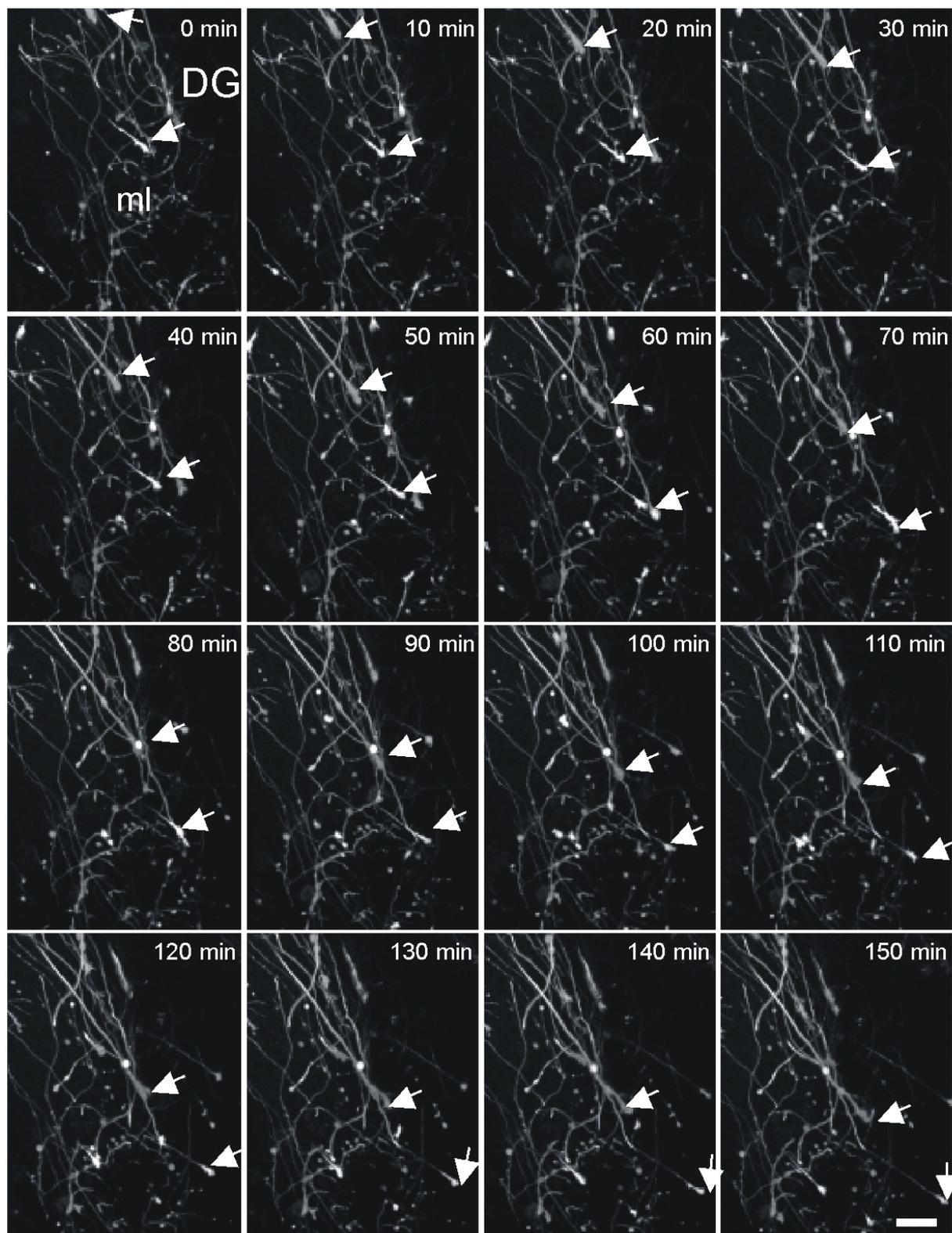
Für die Untersuchung der Einwachsgeschwindigkeit der Axone in den DG wurden Ko-Kulturen im Alter von DIV3 verwendet. Zu diesem Zeitpunkt sind einerseits schon genug

Fasern eingewachsen, um den PP eindeutig erkennen zu können, andererseits sind aber noch vereinzelte Axone und ihre Wachstumskegel auszumachen. Um die Einwachsgeschwindigkeit von entorhinalen Fasern zu bestimmen, wurden solche Wachstumskegel über eine Zeitspanne von mind. 2 Stunden verfolgt. Die Abbildung 18 zeigt die von der 2-Photonen-Anlage aufgenommenen Fasern des ECs, die in die Molekularschicht des DG einwachsen. Zwei Wachstumskegel sind durch Pfeile hervorgehoben.



**Abbildung 18:** *Der Perforant Path im Hippokampus aus einer Ko-Kultur mit einer Thy-1.2-EGFP\_L17 Maus. Der Bilderstapel wurde mit einem 2-Photonen-Laser aufgenommen. Die EGFP positiven Fasern aus dem entorhinalen Kortex wanderten in die Molekularschicht des Gyrus Dentatus (DG, schematisch in rot dargestellt). Nach DIV3 waren genug Fasern eingewachsen, um den PP eindeutig identifizieren zu können. Die Axone waren aber trotzdem noch vereinzelt genug, um einzelne Wachstumskegel auszumachen (gelbe Pfeile). Skala = 20  $\mu$ m.*

Von sichtbaren Wachstumskegeln wurde alle 10 bis 20 min ein Bilderstapel aufgenommen, die dann im Anschluss zu einem Film zusammengesetzt werden konnten. Ein Beispiel ist als Einzelserien in Abbildung 19 gezeigt. Die beiden hervorgehobenen Wachstumskegel bewegten sich mit fortschreitender Zeit in dem gezeigten Gesichtsfeld deutlich nach unten.

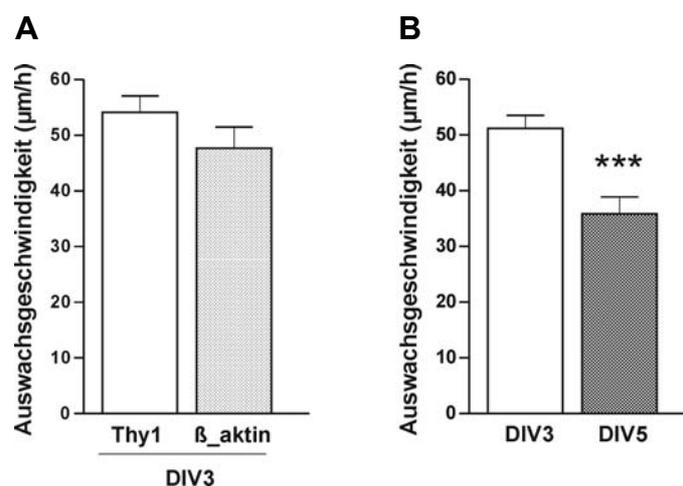


**Abbildung 19:** *Aufgenommene Einzelserien der Wachstumskegel, die über eine definierte Zeitspanne beobachtet wurden. Die EGFP-fluoreszierenden entorhinalen Fasern wuchsen in die Molekularschicht (ml) des Gyrus Dentatus (DG). Zeitraffer-Aufnahmen ermöglichten eine Verfolgung dieser Axone über eine definierte Zeitspanne. Die Auswachsgeschwindigkeit ließ sich schließlich in  $\mu\text{m} / \text{Zeiteinheit}$  ermitteln. Skala =  $20 \mu\text{m}$ .*

### C.2.3 Die Auswachsgeschwindigkeiten der Axone von $\beta$ \_aktin Mäusen und Thy-17 Mäusen unterscheiden sich nicht

Zur Quantifizierung wurde die zurückgelegte Strecke der Fasern pro Zeiteinheit ermittelt und für alle Faser in  $\mu\text{m}$  pro Stunde ( $\mu\text{m}/\text{h}$ ) umgerechnet und angegeben.

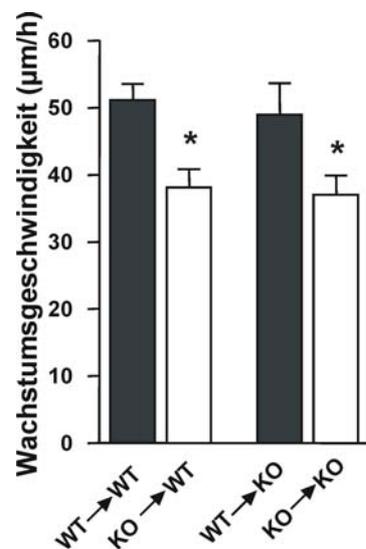
Für die Untersuchung des dynamischen Auswachsverhaltens PRG-1 defizienter Axone wurden Ko-Kulturen verwendet, die aus Kreuzungen mit der Linie Thy-1.2-EGFP\_L17 (kurz Thy-17) stammten. Tiere aus diesem Stamm exprimieren EGFP nur in einzelnen Neuronen und machen die Detektion einzelner Axone und deren Wachstumskegel einfacher, als mit der Linie  $\beta$ \_aktin-EGFP, die für die statischen Analysen verwendet wurde. Um zu zeigen, dass sich die beiden verwendeten EGFP-Mauslinien ( $\beta$ \_aktin und Thy-17) in ihren Auswachsmodalitäten nicht unterscheiden, wurden die Auswachsgeschwindigkeiten von Axonen beider Tiere miteinander verglichen. Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $54.1 \pm 2.93 \mu\text{m}/\text{h}$  für  $\beta$ \_aktin,  $n = 22$ ;  $47.65 \pm 3.78 \mu\text{m}/\text{h}$  für Thy-17,  $n = 19$ ; Abbildung 20 A). Um zu gewährleisten, dass mit dieser Methode überhaupt Unterschiede zu detektieren sind, wurden Ko-Kulturen verschiedenen Alters verwendet, unter der Annahme, dass ältere Axone langsamer auswachsen. Abbildung 20 B zeigt, dass die Wachstumsgeschwindigkeit bei DIV5 Kulturen auf  $35.80 \pm 3.05 \mu\text{m}/\text{h}$  ( $n = 18$ ) sank, im Vergleich zu DIV3 Kulturen mit  $51.11 \pm 2.38 \mu\text{m}/\text{h}$  ( $n = 41$ ). Der Umfang der Stichprobe,  $n$ , setzt sich zusammen aus der Anzahl der Axone, die aus Kulturen stammen, die an mindestens 3 verschiedenen Tagen präpariert wurden.



**Abbildung 20: Auswachsgeschwindigkeiten verschiedener Kulturen.** A) In Bezug auf die Auswachsmodalitäten machte es keinen Unterschied, ob die Ko-Kulturen mit dem EC von einer  $\beta$ \_aktin Maus oder einer Thy-17 Maus präpariert wurden. Axone aus beiden Kulturen wuchsen mit annähernd gleichen Geschwindigkeiten aus. B) Mit Hilfe der life-imaging Experimente konnte festgestellt werden, dass die Axone in älteren Kulturen eine deutlich reduzierte Wachstumsgeschwindigkeit haben. \*\*\* $p < 0.001$ .

### C.2.4 Axone PRG-1 defizienter Mäuse zeigen ein langsames Einwachsen in den Hippokampus als Wildtyp Mäuse

Zur Untersuchung der Wachstumsgeschwindigkeit von PRG-1 defizienten Axonen wurden die gleichen Kombinationen an Ko-Kulturen verwendet wie unter C.1.1 vorgestellt. In Abbildung 21 sind die Ko-Kulturen gegenübergestellt, die sich im Genotyp des ECs unterschieden, aber den gleichen Hippokampus als Zielregion aufwiesen. Es wurde ein signifikanter Unterschied in den Wachstumsgeschwindigkeiten festgestellt, wenn PRG-1 in den Ursprungszellen und somit in den Axonen fehlte, was mit der schwächeren Fluoreszenzintensität bei diesen Kulturen korrelierte. Der Genotyp des Hippokampus schien aber auch hier unerheblich zu sein. Wildtyp Axone waren nicht beeinträchtigt, wenn sie in ein PRG-1 KO Hippokampus einwachsen, und das ohnehin schon verlangsamte Wachstum von PRG-1 defizienter Axone wurde auch nicht noch weiter gesenkt. Die einzelnen Werte sahen wie folgt aus:  $51,11 \pm 2,38 \mu\text{m/h}$  für WT→WT (n = 41),  $38,11 \pm 2,7 \mu\text{m/h}$  für KO→WT (n = 15),  $48,95 \pm 4,69 \mu\text{m/h}$  für WT→KO (n = 15),  $36,98 \pm 2,86 \mu\text{m/h}$  für KO→KO (n = 12).

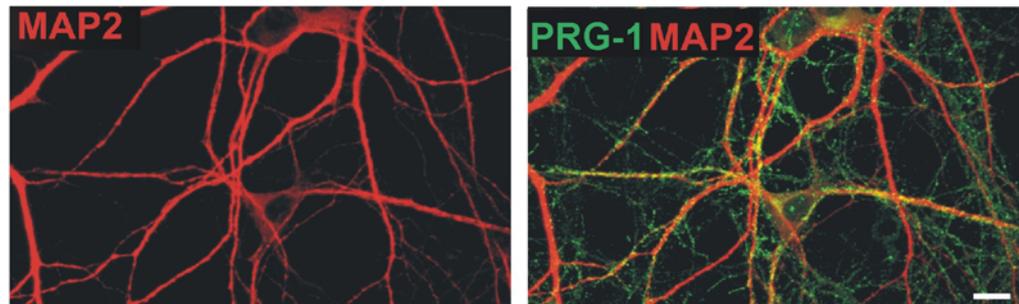


**Abbildung 21:** Die Auswachsgeschwindigkeiten von Ko-Kulturen aus PRG-1 defizienten Mäusen. Die Quantifizierung ergab, dass die Auswachsgeschwindigkeiten deutlich reduziert waren, wenn PRG-1 in den entorhinalen Kortices fehlte. Analog zu den Intensitätsmessungen war auch hier der Genotyp des Hippokampus für die Auswachsmodalitäten der Axone unerheblich. In der Statistik sind die Ko-Kulturen gegenübergestellt, die den gleichen Hippokampus aufwiesen, sich im Genotyp des EC aber unterschieden. Der Pfeil bei z.B. WT→WT kennzeichnet die Auswachsrichtung der Axone von einem Wildtyp EC in einen Wildtyp Hip. \*p < 0.01.

### C.3 PRG-1 ist nicht auf auswachsenden Axonen lokalisiert

Ab dem Zeitpunkt der Geburt kann die mRNA von PRG-1 im EC nachgewiesen werden. Ob PRG-1 bis in das Axon transportiert wird und im Wachstumskegel lokalisiert ist, um dort als sogenanntes Leitmolekül zu fungieren, musste mit Hilfe einer immunhistologischen Färbung geklärt werden.

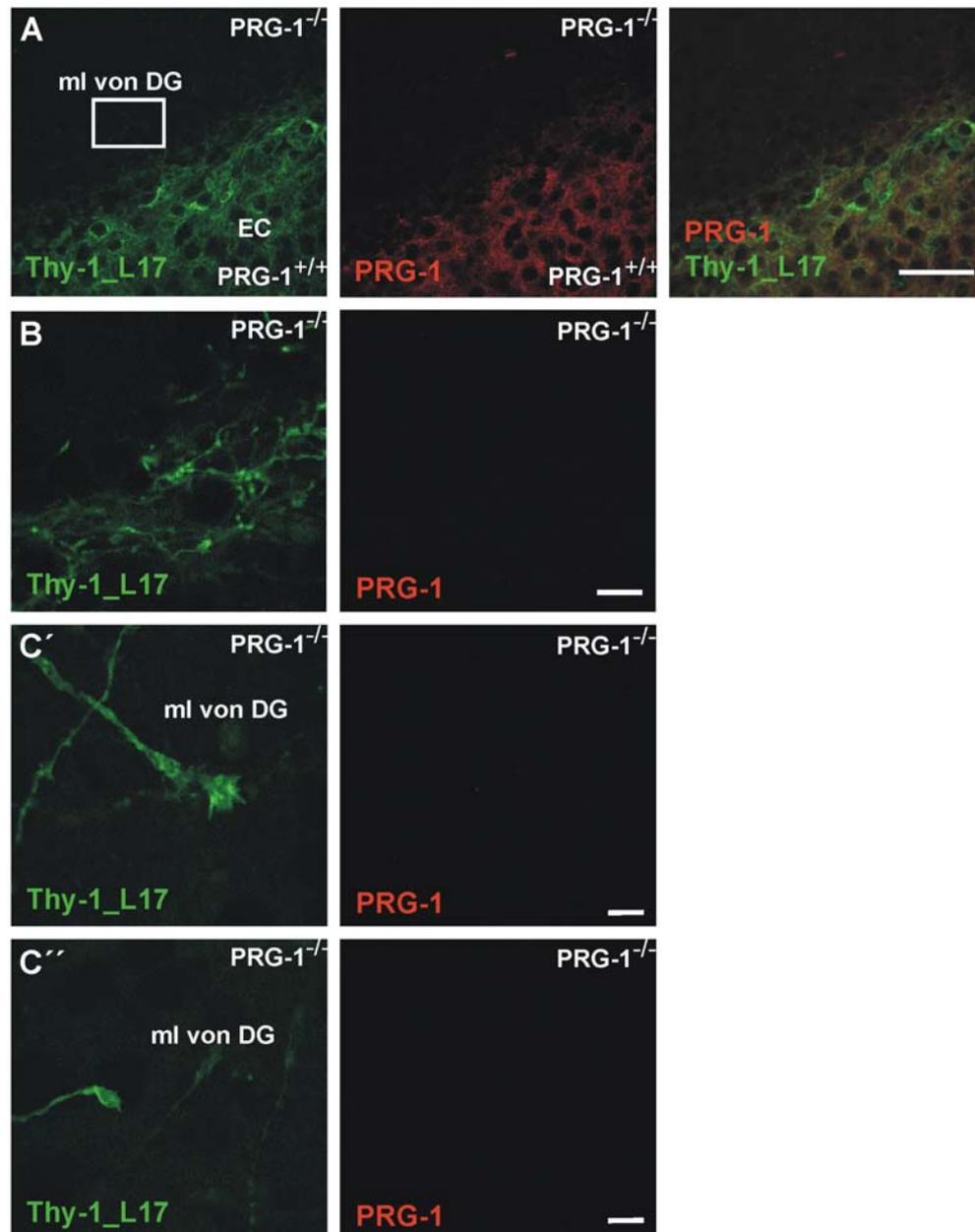
Dazu wurden primäre hippocampale Neurone aus der Maus als Modellsystem gewählt. Durch die Färbung der Neurone mit einem Antikörper, der gegen das Dendriten-spezifische Mikrotubuli-assoziierte Protein 2 (MAP2) gerichtet war, konnten Axone und Dendriten voneinander unterschieden werden. Als Kriterium wurden Axone als MAP2-negative Ausläufer definiert (nach Da Siva, 2004). Mit dem PRG-1 Antikörper konnte die Lokalisation von PRG-1 in Neuronen bestimmt werden. Abbildung 22 zeigt primäre Neurone im Alter von DIV7. Durch die Überlagerung von MAP2 und PRG-1 wurde die Lokalisation von PRG-1 an den Dendriten deutlich. Nicht eindeutig war das schwache Signal auf MAP2-negativen Ausläufern.



**Abbildung 22:** Die Lokalisation von PRG-1 in primären hippocampalen Neuronen. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 7 Tage alten primären Neuronen, die mit einem monoklonalen Antikörper gegen MAP2 (rot) und einem polyklonalen Antikörper gegen PRG-1 (grün) angefärbt wurden. Die Überlagerung der beiden Färbungen machte die PRG-1 Lokalisation auf den Dendriten deutlich. Skala = 10  $\mu$ m.

Um die eventuelle Lokalisation von PRG-1 auf Axonen eindeutig bestimmen zu können, wurden wie oben beschrieben Mischkulturen angefertigt. Der Hippokampus stammte aus einer PRG-1 KO Maus und exprimiert somit kein PRG-1. Der EC stammte aus einer Thy-1.2-EGFP\_L17 Maus, die PRG-1 normal exprimiert. Diese Kulturen wurden nach 3 Tagen fixiert und mit Hilfe eines Vibratoms 50  $\mu$ m dicke Schnitte erstellt. Durch eine immunhistologische Färbung mit dem PRG-1 Antikörper wurden die Zellen des ECs angefärbt, die Zellen des Hippokampus dagegen blieben PRG-1 negativ. PRG-1 positive Axone hätten somit eindeutig auf dem negativen Hintergrund visualisiert werden können. Die

Färbungen zeigten allerdings, dass auf den grün-fluoreszierenden Axonen, die aus dem EC stammten, keine Ko-Lokalisation mit PRG-1 festzustellen war (Abbildung 23).



**Abbildung 23:** *PRG-1 ist in entorhinal-hippokampalen Ko-Kulturen nicht auf auswachsenden Axonen lokalisiert.* Für die genauere Bestimmung der Lokalisation von PRG-1 wurden Kulturen angefertigt, bei denen ein PRG-1 defizienter Hippokampus mit einem WT EC ko-kultiviert wurde. **A)** Der Ausschnitt zeigt den Übergang von dem grün fluoreszierenden EC in den nicht-fluoreszierenden Hippokampus. Eine PRG-1 Färbung (rot) zeigte deutlich, dass der EC, im Gegensatz zum Hippokampus, PRG-1 exprimierte. Skala = 50 µm **B)** Höhere Auflösung der nicht-fluoreszierenden Molekularschicht (ml) des Gyrus Dentatus (DG) mit den grün leuchtenden Fasern, die aus dem EC eingewachsen waren. Die Fasern waren in der Immunfärbung gegen PRG-1 eindeutig negativ. Skala = 7.5 µm. **C' und C'')** Die vergrößerte Aufnahme von einzelnen Axonen zeigte eindeutig, das PRG-1 weder in den Axonen selber noch in deren Wachstumskegel lokalisiert war. Skala = 5 µm.

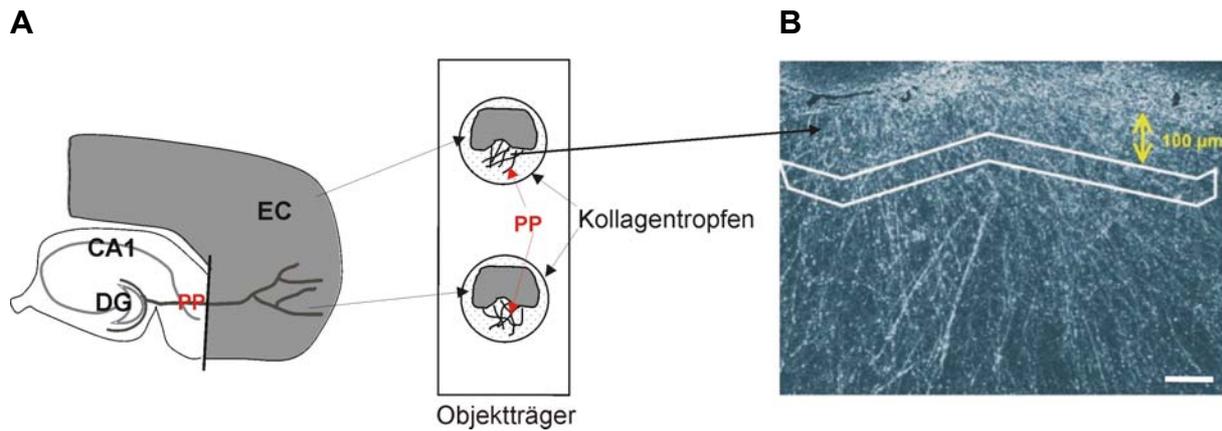
## **C.4 Das Auswachsverhalten PRG-1 defizienter Fasern ist aktivitätsabhängig**

### **C.4.1 Die Blockierung neuronaler Aktivität bewirkt ein normales Auswachsen aus PRG-1 defizienten Explanaten**

Zu Beginn dieser Arbeit wurde angenommen, dass PRG-1 als Leitmolekül am Wachstumskegel das axonale Wachstum reguliert. Da die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass PRG-1 nicht auf dem axonalen Wachstumskegel zu finden ist, muss bei der PRG-1 KO Maus der Prozess des axonalen Auswachsens auf eine andere Weise beeinflusst werden, als durch ein fehlendes Leitmolekül. Durch die Arbeiten von Trimbuch et al. (2009) wurde gezeigt, dass PRG-1 defiziente Tiere eine signifikant höhere Erregbarkeit und eine Erhöhung der mEPSCs (excitatory postsynaptic current) aufweisen. Mit den Experimenten des folgenden Abschnitts sollte geklärt werden, ob die Veränderung in der axonalen Auswachsmodalität in PRG-1 KO Kulturen abhängig von der neuronalen Aktivität ist.

Um diese Hypothese genauer zu untersuchen, wurde ein zweites klassisches neurobiologisches Kulturmodell verwendet, in dem die Axone aus dem EC nicht in den Hippokampus, sondern in eine dreidimensionale Kollagen-Matrix einwachsen (Steup et al., 1999 & 2000). Dieses Modell macht die Quantifizierung der ausgewachsenen Axone unter veränderten Bedingungen einfacher als in dem oben vorgestellten Ko-Kultur Modell.

Die Präparation der EC-Explanate erfolgte wie unter B.4.1.1 beschrieben. Abbildung 24 verdeutlicht noch einmal das Experiment: Der EC, hier grau unterlegt, wurde herauspräpariert und ohne Hippokampus auf einen Objektträger in einen Kollagentropfen gelegt. Die Axone, die in die Kollagen-Matrix einwachsen, entsprechen unter anderem dem PP *in vivo* (Abbildung 24 A). Die Kulturen wurden an DIV2 an einem inversen Mikroskop mit einer 100-fachen Vergrößerung fotografiert. Um in den aufgenommenen Bildern der Kulturen die in die Kollagenmatrix ausgewachsenen Axone deutlicher erkennen zu können, wurden mit Hilfe der Software ImageJ die Farben umgekehrt. Zur Quantifizierung der Faserdichte wurde 100  $\mu\text{m}$  von dem Rand des jeweiligen Explanats entfernt eine Fläche mit einer Größe von  $5 \times 10^4 \mu\text{m}^2$  ( $\pm 5 \%$ ) definiert. Das Programm errechnete automatisch die Dichte der weißen Ausläufer innerhalb dieser Region (Abbildung 24 B).

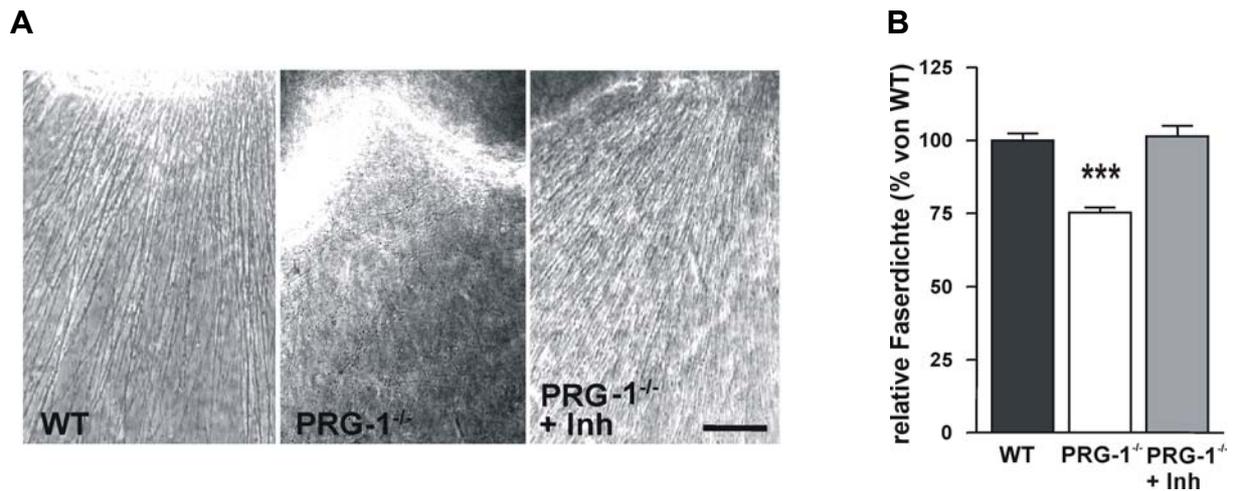


**Abbildung 24:** *Explanate des entorhinalen Kortex (EC) werden in Kollagen kultiviert, um die Dichte der ausgewachsenen Axone zu quantifizieren. A) Der EC (grau) wurde auf einen Objektträger in einen Kollagentropfen gelegt. Die auswachsenden Axone entsprachen denen des Perforant Path (PP) in vivo. B) In einem Abstand von 100 µm vom Rand des Explanats wurde der Grad des Auswachsens ermittelt. Dazu wurde in einer definierten Region mit einer Software die Pixelzahl bestimmt, die in diesem Bereich die Dichte der Axone widerspiegelte. Skala = 100 µm.*

Abbildung 25 A zeigt links einen EC einer WT Maus und mittig den EC einer PRG-1 KO Maus. Wie vermutet, war die Dichte der ausgewachsenen Axone in PRG-1 defizienten ECs wesentlich geringer als in Wildtyp Präparaten.

Um den Einfluss neuronaler Aktivität auf das axonale Auswachsen PRG-1 defizienter Explanate zu untersuchen, wurde eine Mischung von verschiedenen Antagonisten von Ionenkanälen, die neuronale Aktivität vermitteln, in das Medium der Explanate gegeben. Die gewählte Inhibitor-Mischung enthielt 1 µM Tetrodotoxin (TTX), das spannungsabhängige Natriumkanäle blockiert, die für die Entstehung von Aktionspotentialen wichtig sind, 10 µM Nifedipin, das spannungsabhängige Kalziumkanäle vom L-Typ hemmt und 20 µM CNQX, ein AMPA/Kainat Rezeptor Antagonist, von dem gezeigt wurde, dass er die inhibitorischen postsynaptischen Ströme erhöht (Hashimoto et al., 2004). Die gewählten Konzentrationen entsprachen denen der gängigen Literatur (Hutchins und Kalil, 2008; Yamada et al., 2008).

Der Wert für die axonale Dichte der Wildtyp Kulturen wurde gleich 100 % ( $100.0 \pm 2$  % für WT,  $n = 73$ ) gesetzt. Im Vergleich dazu ergab die Analyse der unbehandelten PRG-1 defizienten Explanate einen um 25 % geringeren Wert ( $75.40 \pm 2$  % für PRG-1 KO,  $n = 93$ ). Die Behandlung der PRG-1 KO Explanate mit Aktivitätsinhibitoren hatte den Effekt, dass die Dichte der ausgewachsenen Axone wieder zunahm und sich im Vergleich dem Wert der Wildtyp Kulturen annäherte ( $99.44 \pm 4.3$  % für behandelte PRG-1,  $n = 37$ ). Die Quantifizierung ist in Abbildung 25 B dargestellt. Der Umfang der Stichprobe,  $n$ , setzt sich zusammen aus der Anzahl der Kulturen, die an mindestens 3 verschiedenen Tagen präpariert wurden.



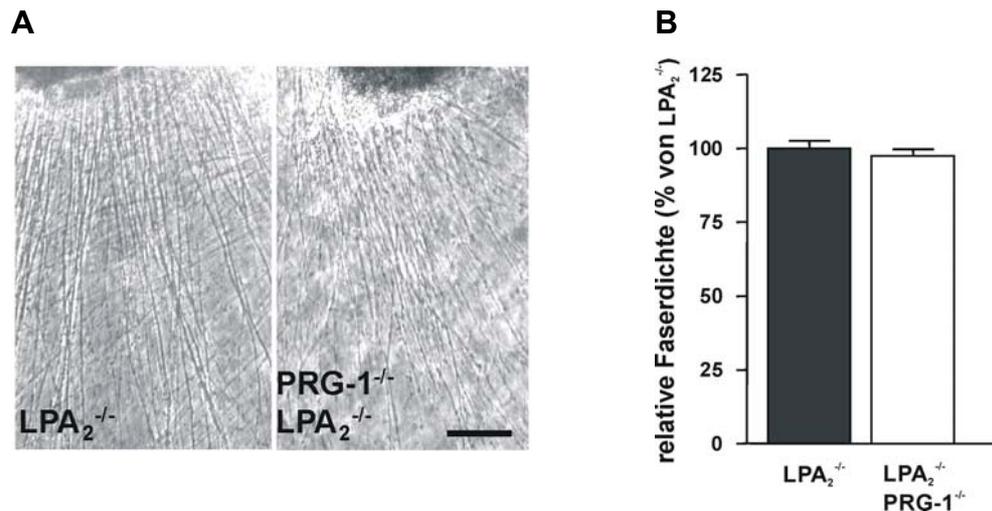
**Abbildung 25: Die Blockierung der neuronalen Aktivität erhöht die Dichte der ausgewachsenen Axone in PRG-1 KO Kulturen.** **A)** Aus PRG-1 defizienten EC Explanaten (PRG-1<sup>-/-</sup>, mitte) wuchsen weniger Fasern aus als aus Wildtyp Explanaten (WT, links). Die Zugabe einer Mischung aus verschiedenen Ionenkanal-Inhibitoren (Inh.), die für die neuronale Aktivität von Bedeutung sind, bewirkte eine Erhöhung der axonalen Dichte in PRG-1 defizienten Kulturen. Skala = 100  $\mu$ m. **B)** Die Quantifizierung zeigte, dass der Wert der behandelten PRG-1 Kulturen fast den Wert der WT Kulturen erreichte. Unbehandelte PRG-1 Kulturen hatten eine um 25 % geringere Dichte der ausgewachsenen Axone. \*\*\* $p < 0.001$ .

Dieses Ergebnis bestärkt die Annahme, dass das veränderte Auswachsverhalten der Axone in der PRG-1 KO Maus auf eine veränderte neuronale Aktivität zurückzuführen ist.

Um die These der Aktivitätsabhängigkeit weiter zu untermauern, wurden Kollagenkulturen angefertigt, die aus Tieren stammten, die für LPA<sub>2</sub> und PRG-1 defizient waren. Trimbuch et al. konnten zeigen, dass diese Tiere keine veränderte neuronale Aktivität aufwiesen. Anders als in der PRG-1 KO Maus konnten hier weder eine Übererregbarkeit noch eine Erhöhung der mEPSCs gemessen werden (Trimbuch et al., 2009).

#### **C.4.2 Explanate aus LPA<sub>2</sub>/PRG-1 doppelt defizienter Tiere zeigen kein eingeschränktes Auswachsverhalten**

Die Kulturen aus den LPA<sub>2</sub>/PRG-1 doppelt defizienten Tieren wurden wie oben beschrieben angefertigt und ausgewertet. Die LPA<sub>2</sub> KO Maus hatte einen anderen genetischen Hintergrund (BalbC) als die PRG-1 KO Maus (C57BL/6). Um für die Kontrolle den gleichen genetischen Hintergrund zu gewährleisten, wurde hier der durchschnittliche Wert für die Faserdichte von LPA<sub>2</sub> KO Tieren aus derselben Zucht gleich 100 % gesetzt (100.0  $\pm$  2.4 %, n = 106). Wie Abbildung 26 zeigt, ergab der Vergleich mit den LPA<sub>2</sub>/PRG-1 doppelt defizienten Explanaten keinen Unterschied in den Dichten der ausgewachsenen Axone.

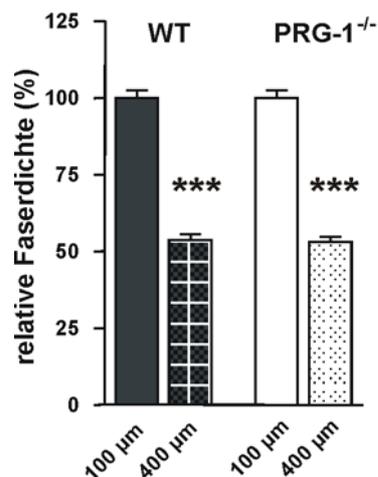


**Abbildung 26:** Das axonale Auswachsen der LPA<sub>2</sub>/PRG-1 Doppel KO Maus ist nicht beeinträchtigt. A) LPA<sub>2</sub>/PRG-1 Doppel KO Tiere wurden für dieses Experiment ausgewählt, da sie, im Gegensatz zur PRG-1 KO Mäusen, keine Überregbarkeit mehr aufweisen. Als Kontrolle wurde hier mit der einfachen LPA<sub>2</sub> KO Maus gearbeitet. Skala = 100 µm. B) Es konnte kein Unterschied in den axonalen Dichten festgestellt werden.

Diese Resultate bestätigen die Aktivitätsabhängigkeit des beobachteten Effektes auf das axonale Auswachsen.

### C.5 Axone von PRG-1 KO und Wildtyp Mäusen unterscheiden sich nicht in ihrer Länge

Um eventuelle Unterschiede in den Längen der ausgewachsenen Fasern zu bestimmen, wurde ebenfalls das Kollagen-Modell verwendet. Dazu wurde in den Kulturen von Wildtyp und PRG-1 KO die axonale Dichte in einem Abstand von 400 µm (Bildrand) von dem Explanat bestimmt. Dieser Wert wurde mit jeweiligen Wert für die axonale Dichte in 100 µm Entfernung (C.4.1) in Relation gesetzt. Sollten die Axone in der PRG-1 KO Maus kürzer sein als in dem Wildtyp und aus diesem Grund ihre Zielregion *in vivo* nicht erreichen, würden in diesem Experiment proportional weniger Axone den Bildrand erreichen als im Wildtyp. Die Quantifizierung allerdings ergab, dass bei den Schnitten aus beiden Tieren etwa 53 % der Fasern auch bei 400 µm noch gemessen werden konnten (WT, 100 µm: 100.0 ± 2.47 %, 400 µm: 53.75 ± 1.69 %, n = 77; PRG-1<sup>-/-</sup>, 100 µm: 100.0 ± 2.49 %, 400 µm: 53.12 ± 1.56 %, n = 98; Abbildung 27).



**Abbildung 27:** *Mit Hilfe der Kollagen-Kulturen wurde festgestellt, dass die Länge PRG-1 defizienter Axone nicht beeinträchtigt ist. Für Wildtyp und PRG-1 KO Kulturen wurden jeweils zwei Werte ermittelt. Der eine repräsentiert die axonale Dichte in 100 µm Entfernung von der Kultur, der andere in 400 µm Entfernung. In beiden Fällen kamen 53 % der Fasern auch bei 400 µm an. \*\*\*p < 0.001.*

Die durchgeführten Messungen der axonalen Länge zeigen, dass die Fähigkeit, Axone in ihrer vollen Länge auszubilden, in der PRG-1 KO Maus nicht beeinträchtigt zu sein scheint.

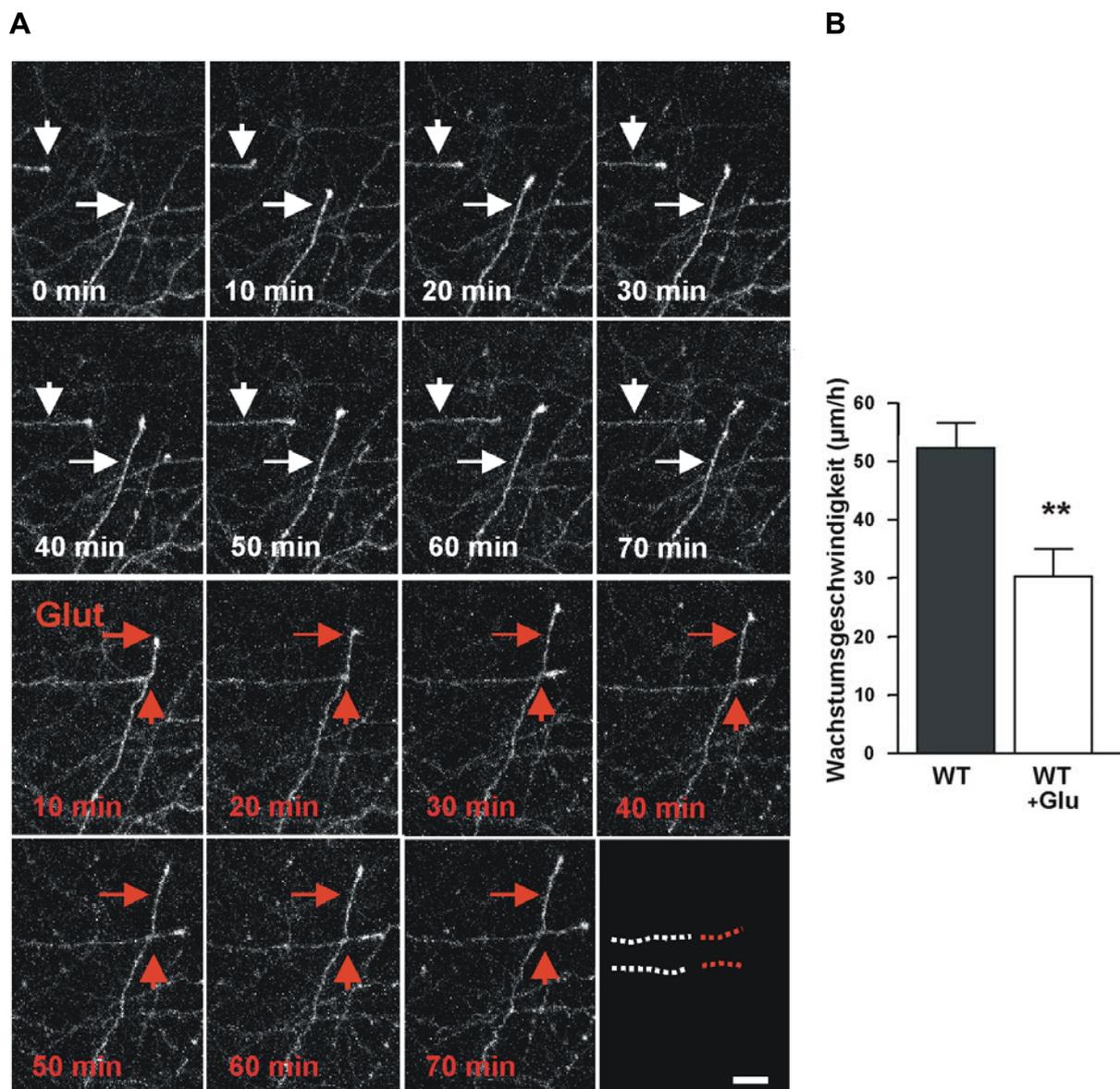
## C.6 Die Zugabe von Glutamat verlangsamt das axonale Wachstum in organotypischen Ko-Kulturen

Es wird angenommen, dass PRG-1 durch Aufnahme von LPA aus dem synaptischen Spalt die glutamaterge Transmission reguliert (Trimbuch et al., 2009). Das Fehlen von PRG-1 scheint also in der PRG-1 KO Maus eine Erhöhung von Glutamat im synaptischen Spalt zu bewirken.

Um zu untersuchen, ob eine erhöhte Konzentration von Glutamat den beobachteten Effekt des verlangsamten Wachstums bewirken könnte, wurde das Auswachsverhalten von Axonen nach Zugabe von 0.5 mM Glutamat beobachtet. Die gewählte Konzentration entsprach der gängigen Literatur (Yamada et al., 2008). Dazu wurden entorhinale-hippokampale Ko-Kulturen mit einem EC aus einer Thy-17 Maus angefertigt. In Bezug auf PRG-1 hatten Hippokampus und EC den Genotyp des Wildtypen.

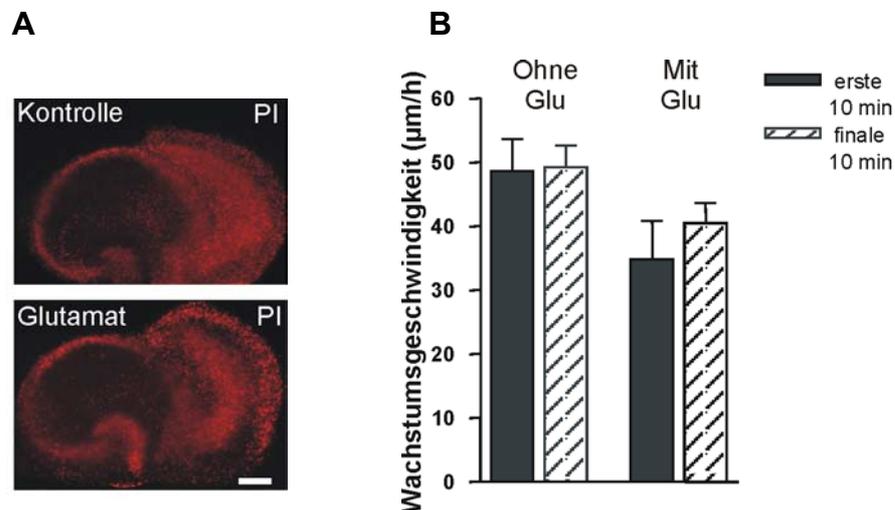
Mit Hilfe der life-imaging Anlage wurden die auswachsenden Fasern an DIV3 beobachtet. Nachdem gewährleistet war, dass die Axone mit der für Wildtypen normalen Geschwindigkeit auswachsen (etwa 50 µm/h, s. C.2.4), wurden 0.5 mM Glutamat (Endkonzentration) zu dem Kulturmedium gegeben. Die Fasern wurden dann noch etwa 1 Stunde gemessen (Abbildung 28 A). Die Quantifizierung der Auswachsgeschwindigkeiten ergab, dass die Fasern nach

Glutamatzugabe deutlich langsamer wurden als vor der Zugabe. Interessanterweise erreichten solche Fasern etwa den Wert von den PRG-1 KO Kulturen ( $52.21 \pm 4.30 \mu\text{m/h}$  vor Glu,  $30.32 \pm 4.58 \mu\text{m/h}$  nach Glu,  $n = 14$ ; Abbildung 28 B). Der Umfang der Stichprobe,  $n$ , setzt sich zusammen aus der Anzahl der Axone, die aus Kulturen stammen, die an mindestens 3 verschiedenen Tagen präpariert wurden.



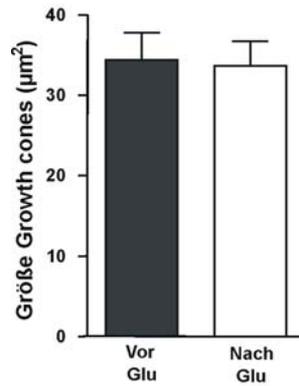
**Abbildung 28:** *Life-imaging Aufnahme einer Wildtyp Ko-Kultur vor und nach der Zugabe von Glutamat. A) Axone aus einer WT Ko-Kultur wurden wie oben beschrieben beobachtet. Nach etwa 1 Stunde wurde  $0.5 \text{ mM}$  Glutamat dem Medium zugegeben. Die Strecke, welche die Axone nach Glutamatzugabe (rot) zurückgelegt haben, war deutlich geringer als vor der Glutamatzugabe in der gleichen Zeit (weiß; zur Verdeutlichung s. gepunktete Linien unten rechts). Skala =  $20 \mu\text{m}$ . B) Die Quantifizierung der Wachstumsgeschwindigkeiten vor und nach Glutamatzugabe bestätigen das langsamere Wachstum. Mit Glutamat wuchsen die Axone nur noch mit einer Geschwindigkeit von etwa  $30 \mu\text{m/h}$ , im Gegensatz zu  $>50 \mu\text{m/h}$  ohne Glutamat.  $**p < 0.01$ .*

Um auszuschließen, dass das verlangsamte Auswachsen auf die Zytotoxizität von Glutamat zurückzuführen ist, wurden die behandelten Kulturen mit dem Vitalitätsmarker PI angefärbt. Als Kontrolle diente eine unbehandelte Kultur. Abbildung 29 A zeigt, dass es keinen Unterschied im Vitalitätsgrad zwischen behandelter und unbehandelter Kultur gab. Zusätzlich wurden die Auswachsgeschwindigkeiten in den ersten 10 min und in den letzten 10 min der gesamten Messung ausgerechnet (Abbildung 29 B). Dadurch konnte sicher gezeigt werden, dass Wildtyp Kulturen ohne Glutamat im Laufe der Messung nicht langsamer wurden (erste 10 min,  $48.62 \pm 4.98 \mu\text{m/h}$ , letzten 10 min,  $49.29 \pm 3.36 \mu\text{m/h}$ ,  $n = 40$ ). Die Reduzierung der Wachstumsgeschwindigkeit nach Zugabe von Glutamat war demnach ein direkter Effekt von Glutamat selbst. Das Wachstum mit Glutamat blieb ebenfalls über die Zeit konstant (erste 10 min,  $34.86 \pm 5.94 \mu\text{m/h}$ , letzten 10 min,  $40.51 \pm 3.07 \mu\text{m/h}$ ,  $n = 11$ ).



**Abbildung 29:** Die Zugabe von Glutamat hatte keinen Einfluss auf die Vitalität der Kulturen. Da Glutamat auf Zellen toxisch wirkt, musste gewährleistet werden, dass die Verringerung der Auswachsgeschwindigkeit nicht auf einen vermehrten Zelltod zurückzuführen war. **A)** Eine Färbung mit dem Vitalitätsmarker PI zeigt keinen Unterschied im Vitalitätsgrad zwischen einer unbehandelten und einer mit Glutamat behandelten Kultur. Skala =  $200 \mu\text{m}$ . **B)** Die Geschwindigkeiten der Fasern in den ersten 10 min der gesamten Aufnahmezeit und die der letzten 10 min unterschieden sich nicht, d.h. sie werden im Laufe der Messung nicht langsamer. Dieses Ergebnis sprach gegen eine Schädigung der Kulturen.

Ein weiteres Indiz für die Vitalität der Kultur und deren Axone war die Tatsache, dass nur eine Geschwindigkeitsverringerng der Axone zu beobachten war und kein Kollaps der Wachstumskegel. Die Flächen der Wachstumskegel waren nach der Behandlung mit Glutamat durchschnittlich genauso groß wie vor der Behandlung (vor Glu,  $34.40 \pm 3.43 \mu\text{m}^2$ , nach Glu,  $33.64 \pm 3.06 \mu\text{m}^2$ ,  $n = 11$ ; Abbildung 30).



**Abbildung 30:** Die Flächen der Wachstumskegel waren vor und nach Zugabe von Glutamat gleich groß. Um die Vitalität der gemessenen Kulturen zu bestimmen, wurde die Fläche eines Wachstumskegels vor der Zugabe von Glutamat bestimmt. Derselbe Wachstumskegel wurde nach Glutamat nochmals ausgemessen und die beiden Werte wurden miteinander verglichen.

Die durchgeführten Experimente verdeutlichen, dass die Axone nicht auf Grund einer sinkenden Vitalität der Kultur langsamer geworden sind. Glutamat beeinflusst die neuronale Aktivität insoweit, dass es zu einer Beeinträchtigung des axonalen Auswachsens kommt.

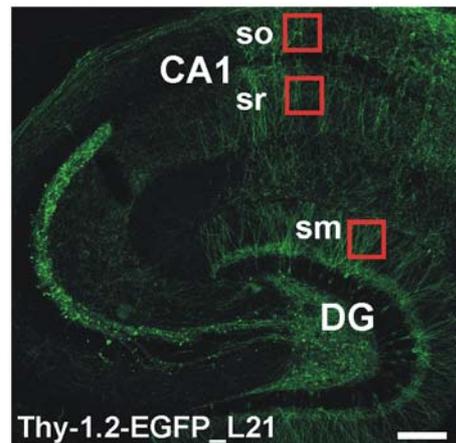
### C.7 Analyse der dendritischen Spines *in vivo*

Es konnte gezeigt werden, dass PRG-1 im DG und in der Cornu Ammonis (CA) Region des Hippokampus exprimiert wird (Brauer et al., 2003), und somit dort lokalisiert ist, wo Dendriten und Synapsen entstehen. In adulten Tieren ist PRG-1 in der postsynaptischen Dichte glutamaterger Neuronen lokalisiert (Trimbuch et al., 2009) und der Höhepunkt der Expression liegt zwischen der zweiten und dritten postnatalen Woche. Das ist genau die Zeitspanne der Synaptogenese und die, in der vermehrt dendritische Spines als exzitatorischer Input gebildet werden.

All diese Tatsachen lassen vermuten, dass PRG-1 an der Entwicklung von Dendriten, Spines und Synapsen beteiligt ist. Im folgenden Abschnitt wird vor allem der Einfluss von PRG-1 auf die Spinesbildung analysiert. Dazu wurde mit der Mauslinie Thy-1.2-EGFP\_L21 gearbeitet. Diese Linie exprimiert EGFP postnatal nicht in allen Neuronen und macht eine *in vivo* Analyse von Spines möglich, da diese gut erkennbar sind. Um den Einfluss von PRG-1 untersuchen zu können, wurden PRG-1<sup>+/-</sup> Tiere mit dieser Linie gekreuzt. Analysiert wurden grüne Wildtyp, PRG<sup>+/-</sup> und PRG<sup>-/-</sup>. Die Genotypisierung der Tiere erfolgte wie unter 2.1 bis 2.4 beschrieben.

Mit Hilfe der Konfokalmikroskopie wurden zwei verschiedene glutamaterge Neuronenpopulationen analysiert. Die Pyramidenzellen der CA1 Region und die

Körnerzellen des DG. In CA1 wurde außerdem zwischen stratum radiatum (sr; apikal) und stratum oriens (so; basal) unterschieden. Im DG wurden Dendritensegmente in den äußeren 2/3 des stratum molekulare (sm) analysiert. Abbildung 31 zeigt eine exemplarische Übersicht der interessanten Regionen.

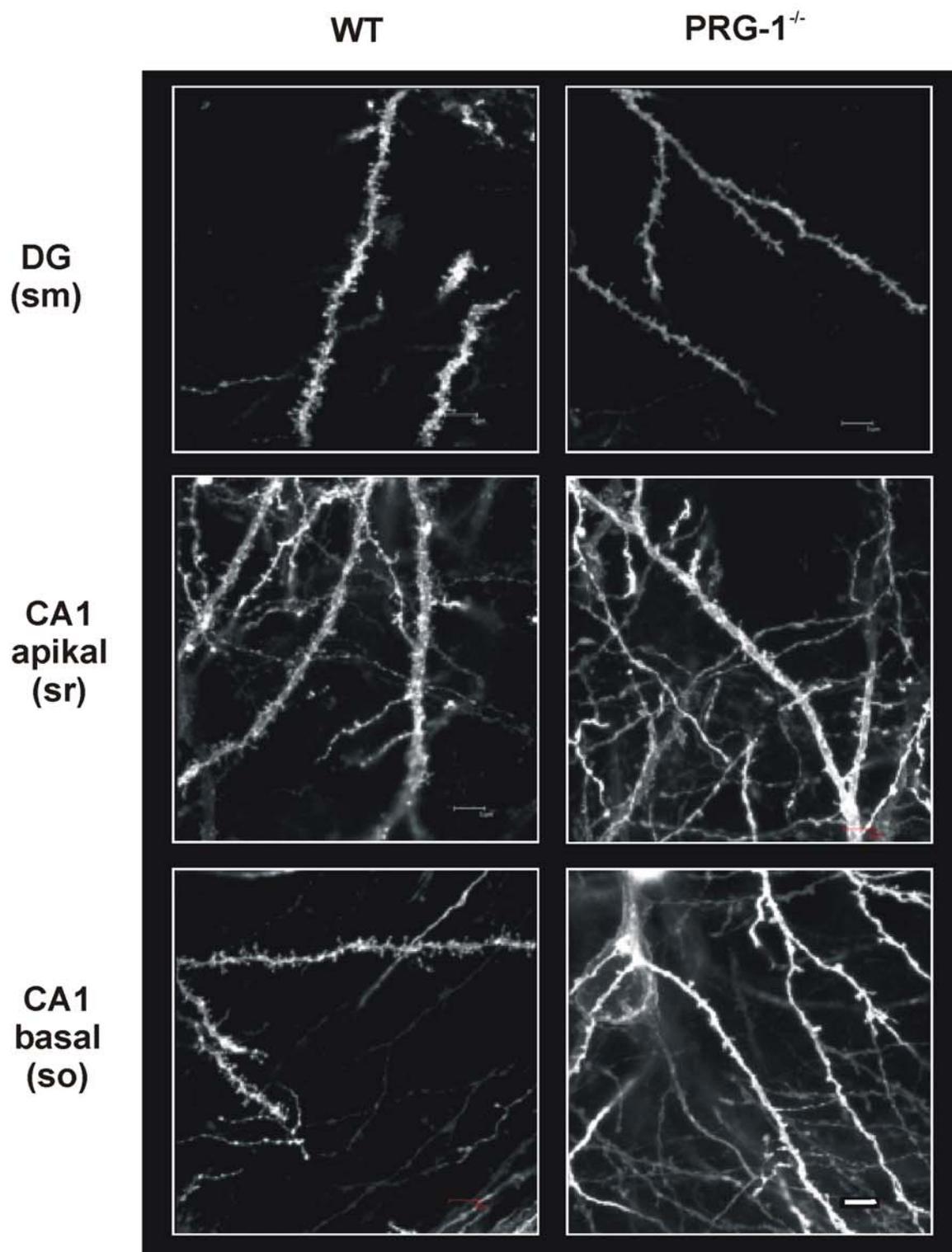


**Abbildung 31:** Für die Analyse der dendritischen Spines wurde die PRG-1 KO Maus mit der Mauslinie Thy-1.2-EGFP\_L21 (kurz Thy21) gekreuzt. Diese Maus exprimiert EGFP nicht in allen Zellen und macht so eine Detektion der einzelnen Neurone, und in einer größeren Auflösung auch der Spines, möglich. In dieser Arbeit wurden drei verschiedenen Regionen des Hippokampus untersucht. Die Molekularschicht (sm) des Gyrus Dentatus (DG), die apikale Seite der CA1 Neurone (stratum radiatum, sr) und die basale Seite (stratum oriens, so) derselben Neurone. Skala = 150  $\mu$ m

Da PRG-1 KO Mäuse am Ende der dritten Lebenswoche (P21) epilepsieartige Anfälle aufweisen (Trimbuch et al., 2009) und solche Anfälle dafür bekannt sind, Einfluss auf die Spines zu haben (Zha et al., 2005), wurden für die Analyse zwei Zeitpunkte gewählt, die vor diesen Anfällen lagen. Als erstes Alter wurde P12 gewählt, da PRG-1 zu diesem Zeitpunkt schon stark exprimiert wird und die Bildung der Spines in diesem Alter stark ansteigt (Bertoni-Freddari et al., 1986). Als zweites Alter wurde P19 gewählt, als Zeitpunkt kurz vor den Anfällen und zu dem Synaptogenese und Spinebildung noch nicht abgeschlossen sind. Abbildung 32 A und 32 B zeigen zu jedem Alter exemplarische Ausschnitte der untersuchten Regionen von Wildtyp und PRG-1 KO Gehirnen. Schon die ersten mikroskopischen Abbildungen ließen auf eine starke Einschränkung der Spinedichte vermuten. Die Dendriten der Wildtyp Maus schienen viel dichter mit Spines bepackt zu sein als die Dendriten der PRG-1 KO Maus. Die Quantifizierung der Spine Dichten erfolgte in den nachfolgenden Abschnitten.

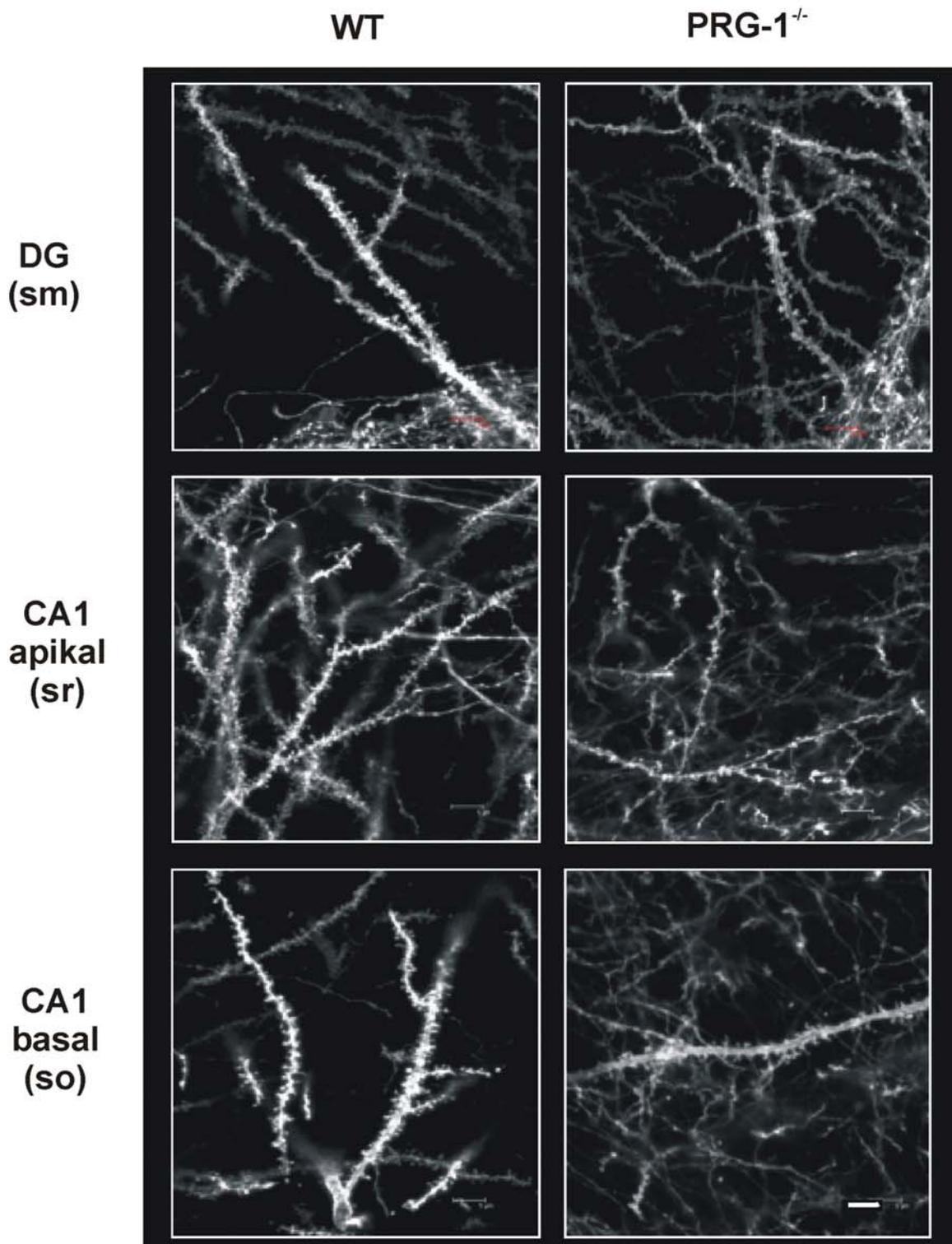
A

P12



B

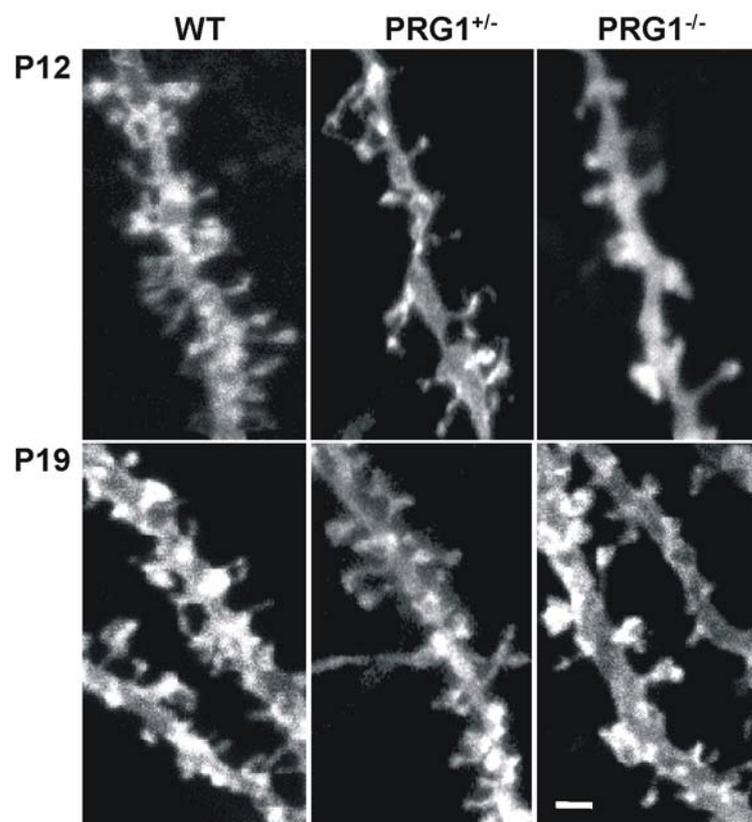
P19



**Abbildung 32:** Konfokal-Aufnahmen von Wildtyp und PRG-1 KO Gehirnschnitten. Dargestellt sind die Regionen, die in Abbildungx vorgestellt wurden. Analysiert wurden zwei verschiedenen Alter, die vor den epilepsieartigen Anfällen der PRG-1 KO Maus lagen. Gehirnschnitte aus **A)** P12 und **B)** P19 Maus. sr = stratum radiatum, so = stratum oriens, sm = stratum moleculare. Skala = 5  $\mu$ m.

### C.7.1 PRG-1 defiziente Dendriten weisen eine wesentlich geringere Spinedichte auf als Wildtyp Dendriten

Für die quantitative Analyse der Spinedichten wurden Aufnahmen in einer höheren Auflösung gemacht. Abbildung 33 zeigt, dass die Spines als Dendritenauswüchse eindeutig zu erkennen waren. Die größeren Aufnahmen bestätigten die Annahme wie oben beschrieben, dass die Dendriten der Wildtyp Tiere dorniger erschienen als die der PRG-1 KO Tiere. Außerdem ließ sich auch erkennen, dass die heterozygote Maus mit ihrer Spinedichte in der Mitte lag.



**Abbildung 33:** *Dendritensegmente in einer hohen Auflösung.* Die Spines waren gut als dendritische Auswüchse zu erkennen. Bei der PRG-1 defizienten Maus (rechts) sind bei beiden Zeitpunkten (P12, obere Reihe und P19, untere Reihe) eindeutig weniger Spines vorhanden als bei der WT Maus (links). Interessanterweise schien die heterozygote Maus (mitte) wertemäßig in der Mitte zu liegen. Skala = 1  $\mu$ m

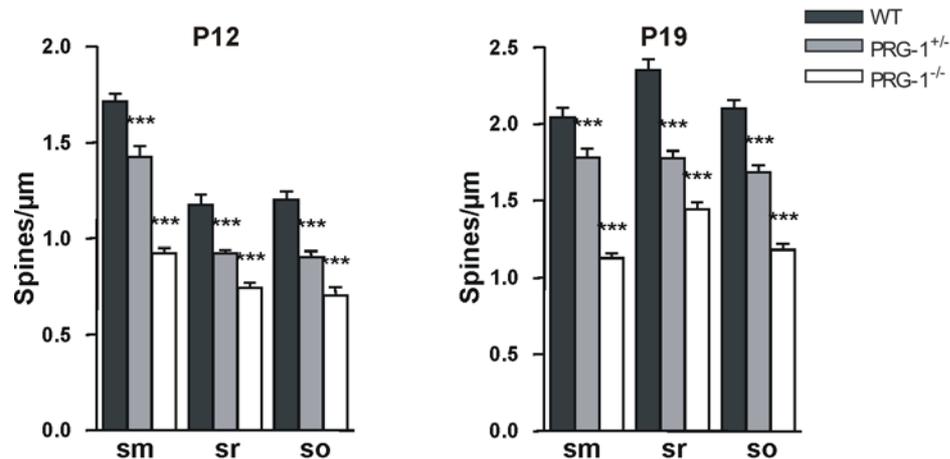
Die Quantifizierung der Spinedichte in stratum oriens (so), stratum radiatum (sr) und stratum moleculare (sm) bei P12 und P19 bestätigte die mikroskopisch gemachten Beobachtungen. In allen drei Bereichen bei beiden Altersstufen war die Spinedichte bei der PRG-1 defizienten Maus um fast die Hälfte geringer als beim Wildtyp. Die heterozygote Maus war in allen Fällen

in der Mitte einzuordnen. Die einzelnen Werte sind in Tabelle 13, die Quantifizierung in Abbildung 34 dargestellt.

Ausgewertet wurden für alle Genotypen jeweils mindestens drei Tiere. Insgesamt wurde für jede Region jeweils 1000 Spines bzw.  $10^3 \mu\text{m}$  Dendrit ausgezählt, je nachdem, welche Bedingung zuerst erfüllt war.

**Tab. 13: Quantifizierungswerte der Spinedichte bei P12 und P19 (in Spines/ $\mu\text{m}$ )**

| Alter | P12        |                      |                      | P19        |                      |                      |
|-------|------------|----------------------|----------------------|------------|----------------------|----------------------|
|       | WT         | PRG-1 <sup>+/-</sup> | PRG-1 <sup>-/-</sup> | WT         | PRG-1 <sup>+/-</sup> | PRG-1 <sup>-/-</sup> |
| sm    | 1.7 ± 0.03 | 1.4 ± 0.05           | 0.93 ± 0.02          | 2.0 ± 0.06 | 1.8 ± 0.06           | 1.1 ± 0.03           |
| sr    | 1.2 ± 0.05 | 0.92 ± 0.01          | 0.74 ± 0.02          | 2.3 ± 0.07 | 1.8 ± 0.04           | 1.4 ± 0.04           |
| so    | 1.2 ± 0.04 | 0.91 ± 0.03          | 0.55 ± 0.02          | 2.1 ± 0.05 | 1.7 ± 0.04           | 1.2 ± 0.03           |



**Abbildung 34: Quantitative Analyse der Spinedichte von P12 und P19 alten Mäusen.** In allen analysierten Regionen und bei beiden Altersstufen war die Spinedichte der PRG-1 KO Maus (PRG-1<sup>-/-</sup>) signifikant geringer als beim Wildtyp (WT) und bei der heterozygoten Maus (PRG-1<sup>+/-</sup>). sm = stratum moleculare, sr = stratum radiatum, so = stratum oriens. \*\*\*p < 0.0001

### C.7.2 Die Größe der Spines ist bei PRG-1 defizienten Tieren nicht beeinflusst

Um einen möglichen morphologischen Effekt zu analysieren und einen ersten Hinweis darauf zu bekommen, ob in der PRG-1 KO Maus neben den Spines auch die Synapsen beeinflusst werden, wurde die Spinefläche bestimmt, da die Größe der Synapse stark mit der Größe der jeweiligen Spines zusammenhängt (Fiala et al., 2002).

Es konnte nur im jüngeren Stadium, bei P12, ein signifikanter Unterschied in der Spinegröße festgestellt werden und dort auch nur in der Molekularschicht des DG. Die Spinefläche bei

der PRG-1 KO Maus war deutlich größer als bei Wildtyp und heterozygoter Maus. Im stratum radiatum konnte eine Tendenz in dieser Richtung festgestellt werden, die aber statistisch nicht signifikant war. Im stratum oriens und bei P19 in allen Regionen war kein Unterschied mehr festzustellen. Die einzelnen Werte sind in Tabelle 14 dargestellt. Für die Auswertung wurden dieselben Bilder herangezogen, die zur Quantifizierung der Spinedichte verwendet wurden. Von jedem 10-ten Spine wurde die Fläche berechnet, d.h. für jedes Alter und dort für jede Region wurden etwa jeweils 100 Spines analysiert. Die Quantifizierung ist in Abbildung 35 gezeigt.

Tab. 14: Quantifizierungswerte der Spinefläche bei P12 und P19 (in  $\mu\text{m}^2$ )

| Alter          | P12         |                      |                      | P19         |                      |                      |
|----------------|-------------|----------------------|----------------------|-------------|----------------------|----------------------|
| Region/Genotyp | WT          | PRG-1 <sup>+/-</sup> | PRG-1 <sup>-/-</sup> | WT          | PRG-1 <sup>+/-</sup> | PRG-1 <sup>-/-</sup> |
| sm             | 0.37 ± 0.01 | 0.42 ± 0.02          | 0.53 ± 0.03          | 0.45 ± 0.02 | 0.44 ± 0.01          | 0.44 ± 0.02          |
| sr             | 0.43 ± 0.02 | 0.47 ± 0.02          | 0.51 ± 0.03          | 0.36 ± 0.01 | 0.37 ± 0.01          | 0.35 ± 0.01          |
| so             | 0.42 ± 0.01 | 0.45 ± 0.02          | 0.41 ± 0.02          | 0.35 ± 0.01 | 0.38 ± 0.01          | 0.35 ± 0.01          |

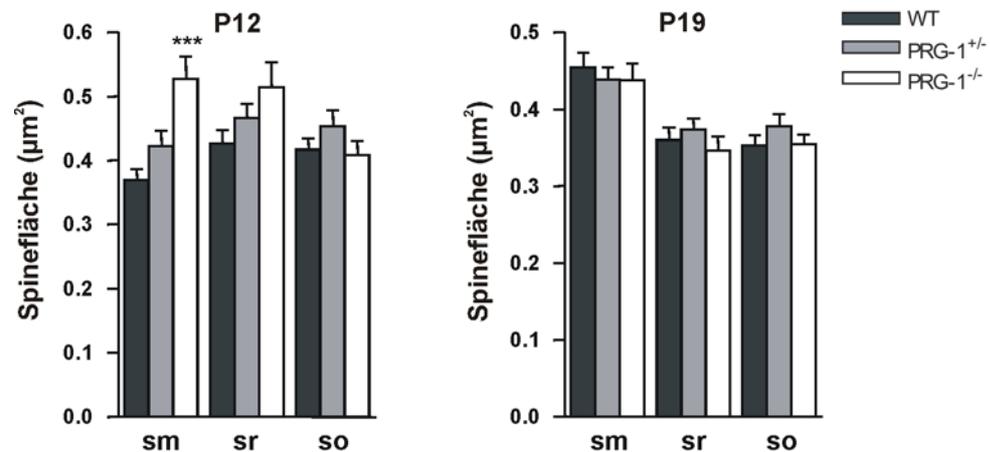
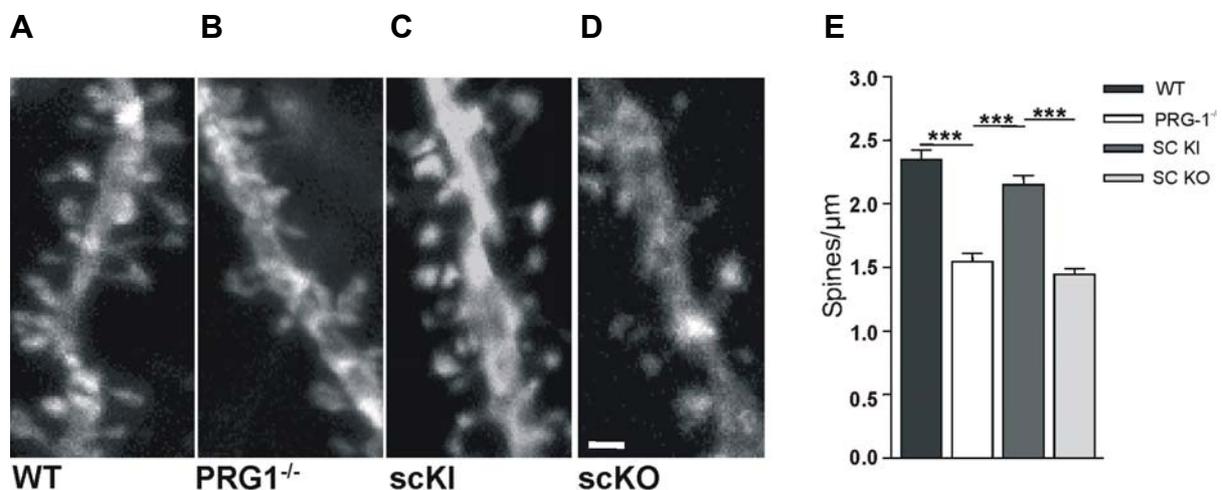


Abbildung 35: **Quantitative Analyse der Spinegröße.** Die Größe der Spines gibt Aufschluss über die Größe der Synapse. Bei P12 war bei der PRG-1 KO Maus in dem sm eine Vergrößerung der Spines zu beobachten. Die Vergrößerung im sr war mit  $p = 0.05$  gerade nicht mehr signifikant. Diese Veränderungen waren bei P19 nicht mehr vorhanden. sm = stratum moleculare, sr = stratum radiatum, so = stratum oriens. \*\*\* $p < 0.0001$ .

## C.8 Die Spinedichte ist direkt abhängig vom postsynaptischen PRG-1

Alle in den nächsten beiden Abschnitten erwähnten *in utero* Elektroporationen wurden am Institut für Zell- und Neurobiologie von Jan Baumgart durchgeführt. Die Schnitte stammten von 3 Wochen alten Tieren.

Um zu analysieren, ob die veränderte Spinedichte ein direkter Effekt von PRG-1 ist oder ein indirekter Effekt in der PRG-1 KO Maus, wurde die PRG-1 Defizienz auf Einzelzellebene untersucht. Dazu wurden Schnitte einer konditionellen KO Maus verwendet, bei der durch eine *in utero* Elektroporation mit einem Cre-Konstrukt auf Einzelzellebene PRG-1 ausgeschaltet wurde (Trimbuch et al., 2009). Durch die Co-Transfektion mit EGFP konnten diese Zellen sichtbar gemacht werden. In dieser Maus waren folglich die grünen PRG-1 defizienten Neurone von nicht-grünen Wildtyp Neuronen umgeben. Eine Störung des gesamten neuronalen Netzwerkes konnte in diesen Mäusen also ausgeschlossen werden und sie wiesen auch keine epilepsieartigen Anfälle auf (Trimbuch et al., 2009). Die Quantifizierung der Spinedichte ergab auch hier eine signifikant geringere Dichte als beim Wildtyp (WT,  $2.3 \pm 0.07$  spines/ $\mu\text{m}$ ; Einzelzell-KO,  $1.5 \pm 0.06$  spines/ $\mu\text{m}$ ; konstitutive PRG-1<sup>-/-</sup>,  $1.4 \pm 0.04$  spines/ $\mu\text{m}$ ; Abbildung 36 A, B, D, E). Des Weiteren wurde untersucht, ob das Einbringen von einem PRG-1 Konstrukt in eine konstitutive PRG-1 KO Maus den Phänotyp des Wildtypus wieder herstellen könnte (Trimbuch et al., 2009). Die Quantifizierung ergab, dass die PRG-1 Expression in einzelnen Zellen, umgeben von PRG-1 defizienten Zellen, wieder eine Spinedichte auf Wildtyp Niveau hervorbrachte (WT,  $2.3 \pm 0.07$  spines/ $\mu\text{m}$ ; Einzelzell-KI,  $2.1 \pm 0.07$  spines/ $\mu\text{m}$ ; Abbildung 36 A, B, C, E).



**Abbildung 36:** Der Einfluss von PRG-1 auf die Spinedichte ist auch auf Einzelzellebene zu beobachten. **A)** Dendritensegment aus der apikalen CA1 Region einer Wildtyp Maus und von **B)** einer konstitutiven PRG-1 KO Maus. **C)** Durch eine *in utero* Elektroporation wurde in eine konstitutive PRG-1 KO Maus ein PRG-1 Konstrukt eingebracht (single cell Knock In = scKI) bzw. **D)** in eine konditionelle PRG-1 KO Maus ein Cre-Konstrukt, das PRG-1 auf Einzelzellebene ausschaltet (single cell Knock Out = scKO). Skala = 1  $\mu\text{m}$ . **E)** Die Quantifizierung ergab, dass PRG-1 auf Einzelzellebene auf die Spinebildung wirkte. Die WT Maus unterscheidete sich nicht von der scKI Maus und die PRG-1 KO Maus unterscheidete sich nicht von der scKO Maus. \*\*\* $p < 0.001$ .

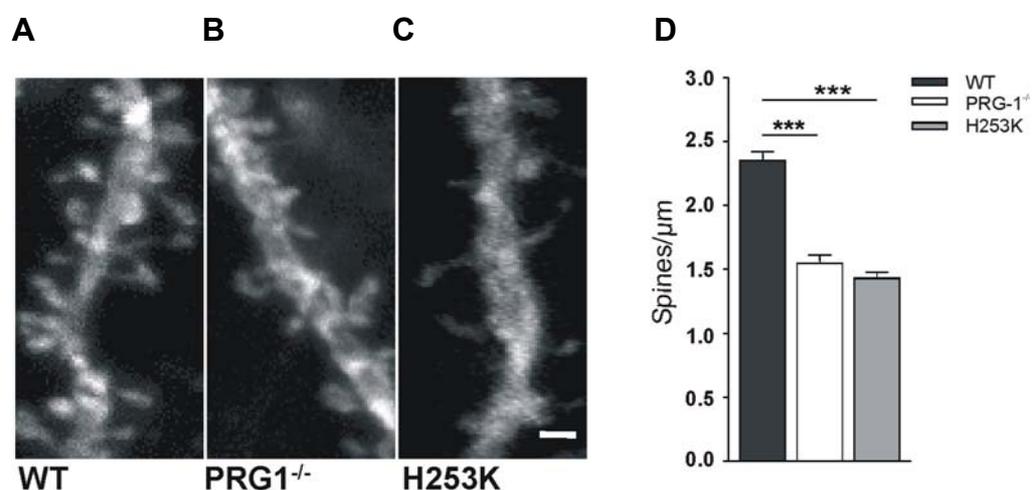
Diese Daten zeigen, dass der Effekt der verringerten Spinedichte direkt auf das Fehlen von PRG-1 an der postsynaptischen Seite zurückzuführen ist.

### C.9 Eine modulierte Phosphatasesequenz in PRG-1 verhindert das Wiederherstellen des Wildtyp Phänotypus

PRG-1 besitzt als Mitglied der LPP Familie in seiner Sequenz konservierte Aminosäurereste, die für die Phosphataseaktivität bei anderen LPPs essentiell sind (Zhang et al., 2000). Trimbuch et al. (2009) konnten zeigen, dass PRG-1 mit Phospholipiden reagiert und dieses in die Zelle aufnimmt. Obwohl PRG-1 augenscheinlich keine Phosphataseaktivität besitzt, scheinen diese Sequenzen für die Bindung von Phospholipiden wichtig zu sein. Ein Austausch vom Histidin-Rest an Stelle 253 zu Lysin (H253K) zerstört bei LPPs die Fähigkeit mit Phospholipiden zu interagieren (Zhang et al., 2000) und bei PRG-1 die Fähigkeit, auf die exzitatorische Transmission zu wirken (Trimbuch et al., 2009).

Dieses punktmutierte Konstrukt wurde durch eine *in utero* Elektroporation in eine konstitutive PRG-1 KO Maus transfiziert (Trimbuch et al, 2009). Hier sollte untersucht werden, ob auch das Einbringen eines mutierten PRG-1 in der Lage ist, den Phänotypen des Wildtypus in einer KO Maus wieder herzustellen oder ob die Fähigkeit, mit Phospholipiden zu interagieren, für die Spinebildung wichtig ist.

Die Quantifizierung ergab, dass Neurone, die das punktmutierte PRG-1 exprimierten, im Vergleich zu PRG-1 defizienten Neuronen keinen Unterschied in der Spinedichte aufwiesen (H253K,  $1.4 \pm 0.04$  spines/ $\mu\text{m}$ ; PRG-1<sup>-/-</sup>,  $1.4 \pm 0.04$  spines/ $\mu\text{m}$ ). H253K PRG-1 war im Gegensatz zu PRG-1 nicht in der Lage, die Spinedichte auf Wildtyp Niveau zu bringen (Abbildung 37).



**Abbildung 37:** Die Transfektion mit einem PRG-1 Konstrukt, das eine veränderte Phosphatasesequenz aufweist, ist nicht mehr in der Lage, die Spinedichte auf Einzelzellebene wieder herzustellen. **A)** Dendritensegment aus der apikalen CA1 Region einer Wildtyp Maus und von **B)** einer PRG-1 KO Maus. **C)** Durch eine in utero Elektroporation wurde in eine PRG-1 KO Maus ein punktmutiertes (H253) PRG-1 Konstrukt eingebracht (single cell Knock In = scKI). Skala = 1  $\mu\text{m}$ . **D)** Die Quantifizierung ergab, dass die Spinedichte dieses in der Phosphatasesequenz veränderte PRG-1 nicht signifikant anders war als die Spinedichte bei einer PRG-1 KO Maus. \*\*\* $p < 0.001$ .

Die in dieser Arbeit generierten Daten deuten darauf hin, dass die Phosphatasesequenz für die Rolle von PRG-1 bei der Formation der Spines essentiell ist.

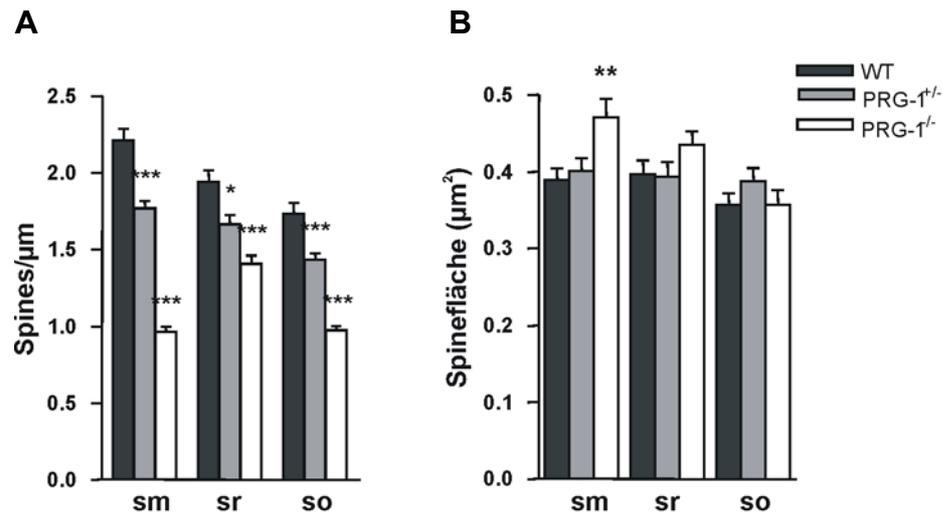
### C.10 Adulte PRG-1 KO Tiere weisen eine niedrige Spinedichte auf

Um zu untersuchen, ob die Spinedichte sich während der Entwicklung in der PRG-1 defizienten Maus normalisiert, wurden die gleichen Regionen wie für die jungen Tiere angegeben (sm = stratum moleculare, sr = stratum radiatum, so = stratum oriens) in adulten Tieren (> 6 Wochen) ausgewertet (einzelne Werte s. Tabelle 14, linke Seite). Die Quantifizierung konnte zeigen, dass die reduzierte Spinedichte bis ins Erwachsenenalter vorhanden ist (Abbildung 38 A). Auch hier sind die heterozygoten Tiere mit ihrer Spinedichte zwischen Wildtyp und PRG-1 KO anzuordnen, was für einen Gendosiseffekt spricht.

Bei der Analyse der Spinemorphologie ergab sich, dass im adulten Alter die Spines in der PRG-1 KO Maus in der Molekularschicht (sm) größer waren als im Wildtyp und in heterozygoten Tieren. Die einzelnen Werte sind in Tabelle 15, rechte Seite, dargestellt, die Quantifizierung in Abbildung 38 B. Diese Tatsache konnte schon bei den sm Spines bei P12 beobachtet werden. Da die heterozygote Maus im Gegensatz zu P12 hier nicht in der Mitte lag, sondern auf dem Niveau des Wildtypus, sprach dieser Effekt für eine morphologische Änderung auf Grund äußerer Einflüsse, wie z.B. epilepsieartiger Anfälle.

Tab. 15: Quantifizierungswerte der Spinedichte und -fläche von adulten Tieren

| Region/Genotyp | Spinedichte (Spines/ $\mu\text{m}$ ) |                      |                      | Spinefläche ( $\mu\text{m}^2$ ) |                      |                      |
|----------------|--------------------------------------|----------------------|----------------------|---------------------------------|----------------------|----------------------|
|                | WT                                   | PRG-1 <sup>+/-</sup> | PRG-1 <sup>-/-</sup> | WT                              | PRG-1 <sup>+/-</sup> | PRG-1 <sup>-/-</sup> |
| sm             | 2.2 ± 0.07                           | 1.8 ± 0.04           | 0.96 ± 0.03          | 0.39 ± 0.01                     | 0.40 ± 0.02          | 0.47 ± 0.02          |
| sr             | 1.9 ± 0.07                           | 1.7 ± 0.06           | 1.4 ± 0.05           | 0.40 ± 0.02                     | 0.39 ± 0.02          | 0.43 ± 0.02          |
| so             | 1.7 ± 0.07                           | 1.4 ± 0.03           | 0.97 ± 0.03          | 0.36 ± 0.01                     | 0.39 ± 0.02          | 0.36 ± 0.02          |

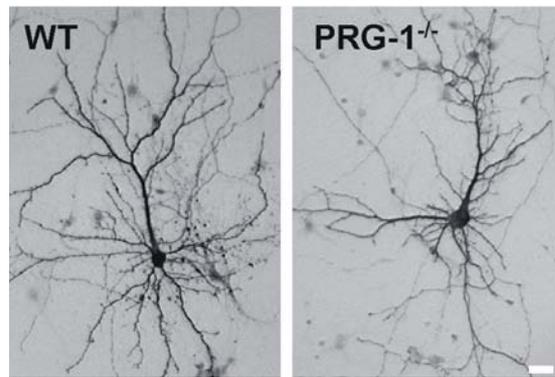


**Abbildung 38: Quantitative Analyse der Spinedichte in adulten Tieren. A)** In allen analysierten Regionen war die Spinedichte der PRG-1 KO Maus signifikant geringer als beim WT und bei der heterozygoten Maus. **B)** Eine Vergrößerung der Spines war nur bei der KO Maus im sm zu beobachten. sm = stratum moleculare, sr = stratum radiatum, so = stratum oriens. \* $P < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### C.11 PRG-1 hat Einfluss auf die Dendritenmorphologie primärer hippocampaler Neurone *in vitro*

Um den Einfluss von PRG-1 in einzelnen neuronalen Zellen näher zu untersuchen, wurde mit hippocampalen primären Neuronen gearbeitet. Mit diesem Modell-System konnte neben der Spineanalyse auch mehr auf die Analyse der Dendritenkomplexität eingegangen werden. Dass PRG-1 in diesem Modell-System exprimiert wird, konnte schon in C.3 gezeigt werden. Die primären Zellen wurden für Wildtyp und PRG-1 KO separat aus den jeweiligen Hippokampi hergestellt. Die anschließenden Analysen beschränkten sich auf Neurone mit eindeutig unterscheidbaren basalen und apikalen Dendriten.

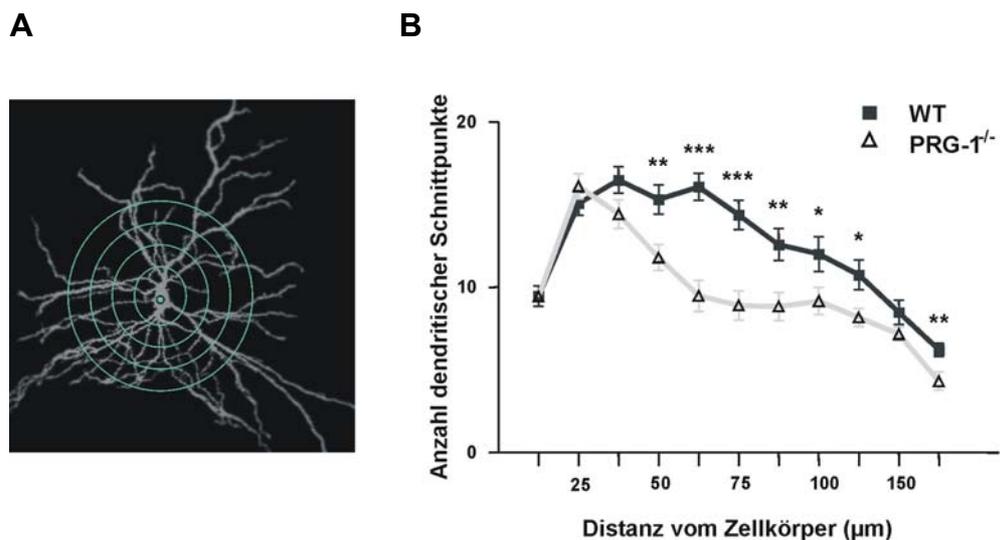
Für die Untersuchung der Dendritenmorphologie wurden die Zellen an DIV12 mit EGFP transfiziert und 2 Tage später, nach Fixierung, durch eine DAB Entwicklung sichtbar gemacht. Das erlaubte die Analyse der Zellen mit Hilfe des Durchlichtmikroskops (Abbildung 39).



**Abbildung 39:** Schon die mikroskopische Untersuchung ergab, dass die dendritischen Bäume der Wildtyp Zellen (links) komplexer waren, als die der PRG-1 defizienten Neurone (rechts). Die Neurone wurden an DIV12 mit EGFP transfiziert und 2 Tage später mit einer DAB Färbung für das Durchlichtmikroskop sichtbar gemacht. Skala = 20 µm.

Eine wirksame Methode, das dendritische Verzweigungsmuster von Neuronen zu untersuchen, ist die Sholl-Analyse (Sholl, 1953). Dazu werden konzentrische Kreise mit zunehmend größer werdendem Radius um die Somata der Neurone gezogen und die Anzahl der Schnittpunkte der Dendritenbäume mit diesen Kreisen bestimmt (Abbildung 40 A).

Die Sholl-Analyse zeigte, dass sich das Dendritenmuster durch das Fehlen von PRG-1 im Vergleich zu EGFP-transfizierten Wildtyp Zellen verändert hatte. Die geringere Anzahl an Schnittpunkten bei den PRG-1 defizienten Zellen lies auf eine Reduzierung der Dendritenkomplexität schließen (Abbildung 40 B).



**Abbildung 40:** Die Sholl Analyse bestätigt, dass die Dendritenkomplexität in PRG-1 defizienten Neuronen im Vergleich zu Wildtyp Zellen geringer ist. A) Bei der Shollanalyse werden konzentrische Ringe mit zunehmendem Radius um das Soma eines Neurons gelegt. B) Die Bestimmung der Anzahl an Schnittpunkten mit diesen Ringen ergab, dass WT Zellen signifikant mehr Schnittpunkte aufwiesen als PRG-1 KO Zellen. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

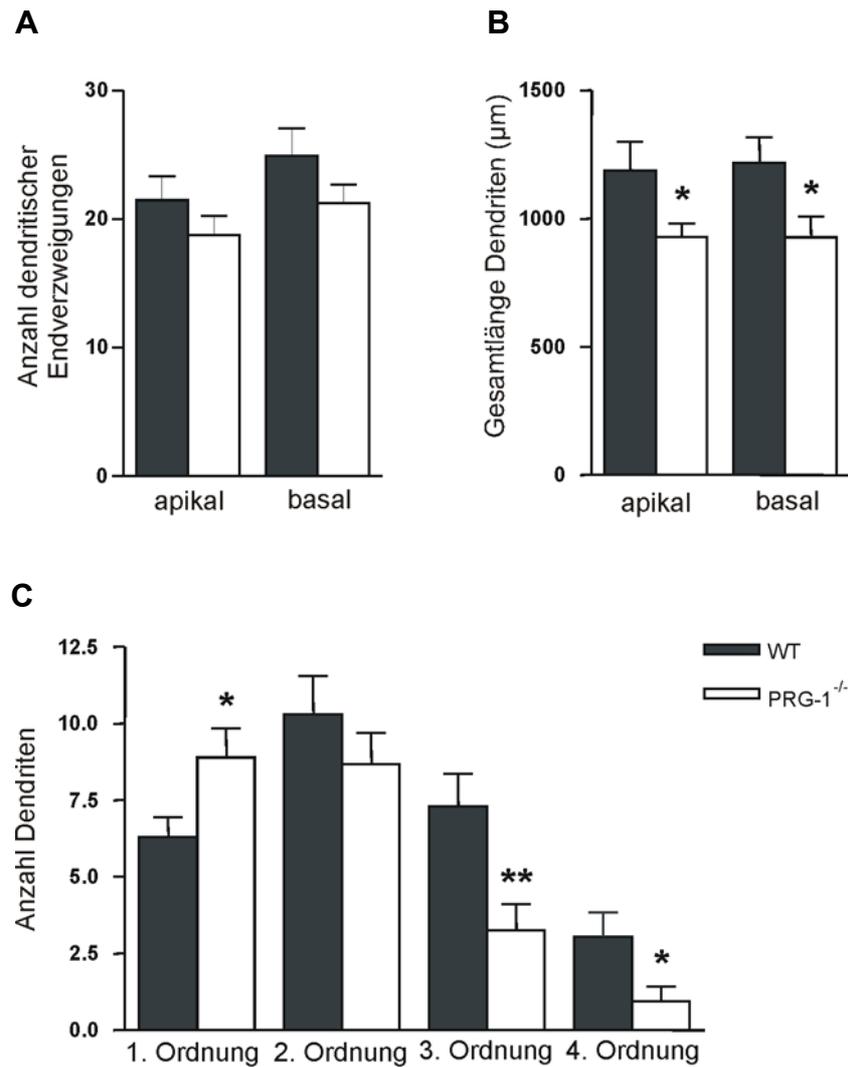
Für eine detailliertere Beschreibung des dendritischen Phänotypus wurde für die apikalen und basalen Dendriten die Anzahl dendritischer Endverzweigungen ('number of dendritic end tips', NDET nach Brandt et al. (2007)) gezählt, sowie deren Gesamtlänge gemessen. Außerdem wurde die Anzahl von Dendriten höherer Ordnung bestimmt. Ein Dendrit 1. Ordnung entspringt direkt dem apikalen Dendriten, ein Dendrit 2. Ordnung zweigt von dem Dendriten 1. Ordnung ab usw.

Die NDET Messung ergab interessanterweise keinen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und PRG-1 KO Zellen, weder in apikalen noch in basalen Dendriten. Allerdings war für beide Regionen eine deutliche Tendenz in die Richtung zu erkennen, dass der NDET-Wert in PRG-1 defizienten Neuronen vermindert war (**apikal:** WT,  $21.47 \pm 1.85$ ,  $n = 17$ ; PRG-1<sup>-/-</sup>,  $18.74 \pm 1.52$ ,  $n = 19$ ; **basal:** WT,  $24.94 \pm 2.10$ ,  $n = 17$ ; PRG-1<sup>-/-</sup>,  $21.26 \pm 1.43$ ,  $n = 19$ ; Abbildung 41 A).

Die Messung der Dendritenlängen ergab, dass diese in beiden Regionen in PRG-1 defizienten Neuronen reduziert waren (**apikal:** WT,  $1188 \pm 111.4 \mu\text{m}$ ,  $n = 17$ ; PRG-1<sup>-/-</sup>,  $927.1 \pm 53.61 \mu\text{m}$ ,  $n = 19$ ; **basal:** WT,  $1217 \pm 100.5 \mu\text{m}$ ,  $n = 17$ ; PRG-1<sup>-/-</sup>,  $926.6 \pm 80.30 \mu\text{m}$ ,  $n = 19$ ; Abbildung 41 B).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass PRG-1 defiziente Zellen mehr Dendriten 1. Ordnung ausgebildet hatten als Wildtyp Zellen, allerdings wesentlich weniger Dendriten höherer Ordnung (Abbildung 41 C).

Der Umfang der Stichprobe,  $n$ , setzt sich zusammen aus der Anzahl der Zellen, die an mindestens 3 verschiedenen Tagen präpariert wurden.



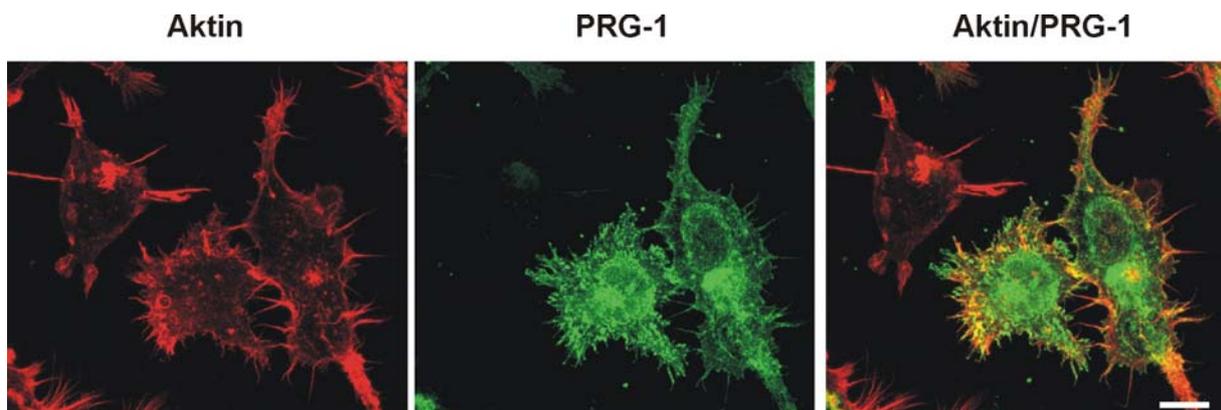
**Abbildung 41: Analyse der Dendritenkomplexität.** A) Die dendritischen Endverzweigungen apikaler und basaler Dendriten waren in PRG-1 defizienten Neuronen nur tendenziell verringert.  $p_{\text{apikal}} = 0,25$  und  $p_{\text{basal}} = 0,15$ . B) Die Gesamtlänge PRG-1 defizienter Neurone allerdings war signifikant reduziert. C) Das Fehlen von PRG-1 senkte die Anzahl der Dendriten höherer Ordnung. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

Diese Ergebnisse weisen eindeutig auf eine Beteiligung von PRG-1 an der Dendritenentwicklung hin. Das Fehlen von PRG-1 führt zu weniger komplexen Dendritenbäumen durch Reduzierung der Dendritenverzweigungen und zur Verkürzung der Dendriten selber.

## C.12 Die Überexpression von PRG-1 führt in nicht-neuronalen Zellen zur vermehrten Bildung von Filopodien

Als erste Annäherung zur Untersuchung, ob PRG-1 auch in Zellkultur auf die Spinesbildung wirkt, wurden nicht-neuronale HEK293-Zellen mit einem PRG-1 Konstrukt (pFlag-mPRG-1; M. Pockrand, Bachelorarbeit 2008) transfiziert. Erfolgreich transfizierte Zellen konnten mit dem PRG-1 Antikörper angefärbt und so von nativen Zellen unterschieden werden, die PRG-1 nicht exprimierten. Zusätzlich zur Färbung mit PRG-1 wurde das F-Aktin der Zellen mit einer Phalloidin-Färbung sichtbar gemacht.

Die Transfektion von PRG-1 führte zu einer stark erhöhten Bildung von langen dünnen Fortsätzen, sogenannten Filopodien, um die Zellkörper herum (Abbildung 42). Da dieser Phänotyp mikroskopisch schon eindeutig zu erkennen war, erfolgte an dieser Stelle keine Quantifizierung.



**Abbildung 42:** *CaCl<sub>2</sub>-Transfektion von HEK293-Zellen mit PRG-1.* Das Aktin der Zellen wurde mit einer Phalloidin-Färbung (rot) sichtbar gemacht. Erfolgreich transfizierte Zellen konnten mit einer PRG-1 Färbung (grün) identifiziert werden. Die Zelle oben links wurde nicht mit PRG-1 transfiziert und erschien bei der Überlagerung der Färbungen nur rot. Die PRG-1 positiven Zellen wiesen im Vergleich viel mehr Filopodien auf. Die Färbung zeigte, dass PRG-1 auch in diesen Ausläufern lokalisiert war. Skala = 10  $\mu$ m.

## C.13 PRG-1 hat Einfluss auf die Spinebildung in primären hippocampalen Neuronen *in vitro*

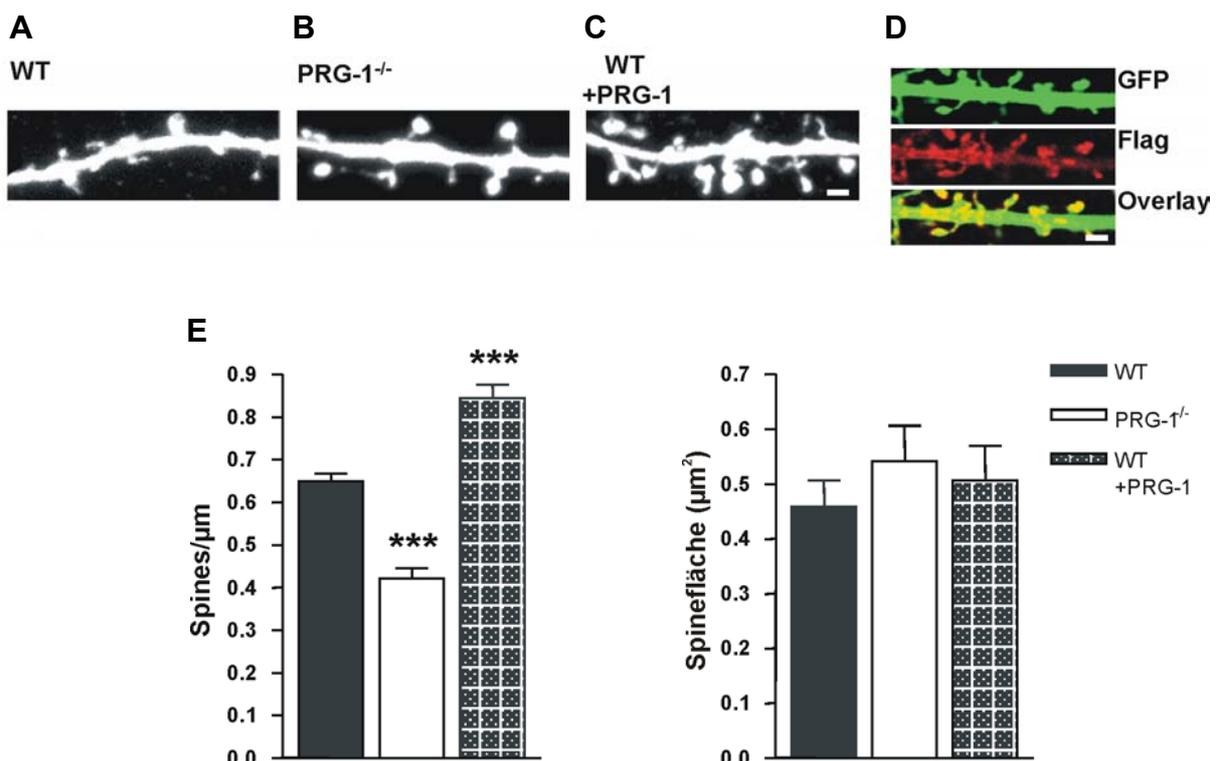
Ob die PRG-1 Defizienz *in vitro* den Effekt der reduzierten Spinebildung, der schon *in vivo* beobachtet wurde, hervorrufen würde, wurde mit primären hippocampalen Neuronen aus Wildtyp und PRG-1 KO Tieren untersucht. Zusätzlich sollte auch hier der Effekt der Überexpression von PRG-1 analysiert werden. Dafür wurde das schon bei den

HEK293-Zellen verwendete Konstrukt pFlag-mPRG-1 in neuronale Wildtyp Zellen transfiziert.

Die Zellen wurden an DIV8 mit EGFP bzw. mit pFlag-mPRG-1/EGFP transfiziert und an DIV14 fixiert. Da die Auswertungen mit dem Konfokalmikroskop durchgeführt werden sollten, wurden erfolgreich transfizierte Zellen hier mit Fluoreszenzfarbstoffen sichtbar gemacht. Das EGFP Signal wurde mit einem polyklonalen Antikörper verstärkt, PRG-1 überexprimierende Zellen wurden zusätzlich mit einem monoklonalen Antikörper gegen das Flag-Epitop angefärbt (Abbildung 43 A-D).

Für die Auswertung wurden Zellen aus mindestens drei verschiedenen Präparationen verwendet. Insgesamt wurden, analog zu den *in vivo* Analysen, für jede Bedingung jeweils 1000 Spines bzw. 1000  $\mu\text{m}$  Dendrit ausgezählt, je nachdem, welche Bedingung zuerst erfüllt war.

Die Quantifizierung der Spinedichte von primären Neuronen bestätigte die Beobachtungen, die *in vivo* gemacht wurden. Die Anzahl der Spines war in PRG-1 defizienten Zellen deutlich reduziert. Zusätzlich zeigte sich, dass die erhöhte Expression von PRG-1 in Wildtyp Zellen, im Vergleich zu untransfizierten Wildtyp Zellen, eine Vermehrung der Spines zur Folge hatte (WT,  $0.65 \pm 0.02$  spines/ $\mu\text{m}$ ; PRG-1<sup>-/-</sup>  $0.42 \pm 0.02$  spines/ $\mu\text{m}$ ; WT + PRG-1  $0.84 \pm 0.03$  spines/ $\mu\text{m}$ ). *In vitro* konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der Größe der Spines festgestellt werden (WT,  $0.46 \pm 0.04$   $\mu\text{m}^2$ ; PRG-1<sup>-/-</sup>  $0.54 \pm 0.06$   $\mu\text{m}^2$ ; WT + PRG-1,  $0.51 \pm 0.06$   $\mu\text{m}^2$ ; Abbildung 43 E).

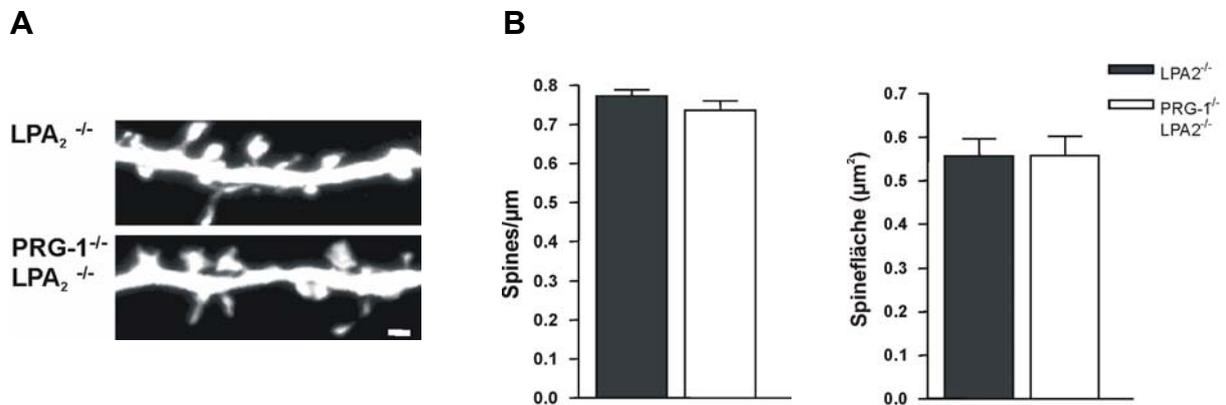


**Abbildung 43: PRG-1 verstärkt die Spinedichte in vitro.** A) Wildtyp und B) PRG-1 defiziente Neurone wurden separat kultiviert und an DIV8 mit EGFP transfiziert. Die Fixierung erfolgte an DIV14. C) Zusätzlich wurden WT Zellen mit EGFP und einem pFlag-mPRG-1 Konstrukt transfiziert, um PRG-1 dort verstärkt zu exprimieren. D) Erfolgreich transfizierte Zellen wurden durch eine Färbung gegen das Flag-Epitop (rot) sichtbar gemacht. Skala = 1  $\mu\text{m}$ . E) Die Quantifizierung zeigt die Verringerung der Spinedichte bei PRG-1 KO Zellen und die Erhöhung der Spinedichte bei überexprimierten WT Zellen. Die Größe der Spines war bei keiner Bedingung verändert.  $***p < 0.0001$

#### C.14 LPA<sub>2</sub>/PRG-1 doppelt defiziente Neurone zeigen keinen Effekt in der Spinedichte

Mit Hilfe von primären Neuronen sollte auch die LPA<sub>2</sub>/PRG-1 Doppel-KO Maus, die schon in C.4.2 vorgestellt wurde, im Hinblick auf Spinedichte und -größe untersucht werden.

Die Präparation und Auswertung der Neurone erfolgte äquivalent zum vorherigen Abschnitt. Die Quantifizierung ergab für beide Parameter, dass es zwischen LPA<sub>2</sub>/PRG-1 KO und LPA<sub>2</sub> KO, die als Kontrolle diente, keinen signifikanten Unterschied gab (Spinedichte: LPA<sub>2</sub><sup>-/-</sup>,  $0.77 \pm 0.02$  spines/ $\mu\text{m}$ ; LPA<sub>2</sub><sup>-/-</sup>/PRG-1<sup>-/-</sup>,  $0.74 \pm 0.03$  spines/ $\mu\text{m}$ ; Spinegröße: LPA<sub>2</sub><sup>-/-</sup>,  $0.56 \pm 0.04$   $\mu\text{m}^2$ ; LPA<sub>2</sub><sup>-/-</sup>/PRG-1<sup>-/-</sup>,  $0.56 \pm 0.04$   $\mu\text{m}^2$ ; Abbildung 44)



**Abbildung 44: Die Analyse der Spines von LPA<sub>2</sub>/PRG-1 defizienten Neuronen ergab keinen Unterschied in Anzahl und Größe.** A) Dendritensegmente aus LPA<sub>2</sub> KO Kultur, die hier als Kontrolle diente und aus LPA<sub>2</sub>/PRG-1 KO Kultur. Skala = 1  $\mu\text{m}$ . B) Quantifizierung der Anzahl und der Größe der Spines.

## D Diskussion

### D.1 PRG-1 und auswachsende Axone

Im zentralen Nervensystem (ZNS) wachsen die Axone der Nervenzellen, besonders während der Entwicklung im Zuge der Ausbildung des neuronalen Netzwerkes, über weite Entfernungen hin zu den Zellen ihrer Zielregion. Während dieser Phase ist der Wachstumskegel die mobile Struktur an der Spitze des Axons. Durch Rezeptoren an der Zelloberfläche des Wachstumskegels aktivieren extrazelluläre Leitmoleküle intrazelluläre Signalkaskaden, die dann auf die Mobilität des Wachstumskegels einwirken (Nakamura et al., 2000). Wichtig wird diese Struktur erneut bei einer Schädigung des adulten Gehirnes, da es da zu einem regenerativen Auswachsen der Axone kommen kann.

PRG-1, ein Mitglied der Familie der Lipid-Phosphat Phosphatasen, wurde auf der Suche nach Molekülen entdeckt, deren Expression während einer solchen Schädigung ansteigt. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Molekül nach einer entorhinalen Kortexläsion und auch während der Entwicklung hochreguliert wird (Brauer et al., 2003), wobei ein erstes Signal auf Proteinebene bei E19 detektiert werden kann (persönliche Kommunikation, Olga Kieselmann, Charité). Die Tatsache, dass PRG-1 anfängt exprimiert zu werden, wenn die axonalen Projektionen gebildet werden und dass PRG-1 auf neu auswachsenden Axonen nach Läsion gefunden werden konnte, ließ den Schluss zu, dass PRG-1 an der axonalen Wegfindung beteiligt sein könnte.

Um die Rolle von PRG-1 beim Auswachsen von spezifischen Axonen näher zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit mit einem weitverbreiteten Ko-Kultur-Modell gearbeitet, das einen EC aus einer EGFP-exprimierenden Maus mit einem Wildtyp Hippokampus kombiniert. Die grün-fluoreszierenden Fasern des Perforant Path (PP) wachsen in die Molekularschicht des nicht-fluoreszierenden Gyrus Dentatus (DG) und machen eine Detektion und Verfolgung dieser Axone möglich. Durch die Kreuzung der EGFP-exprimierenden Maus mit einer Maus, bei der durch den spezifischen Austausch der Exons 4 bis 6 *prg-1* in allen Körperzellen ausgeschaltet wurde (konstitutiver PRG-1 KO; Trimbuch et al., 2009), konnte der Effekt des fehlenden PRG-1 auf das axonale Auswachsen beobachtet werden.

Diese Ko-Kulturen wurden für zwei verschiedene Arten von Experimenten verwendet. Zum einen sollte durch die Messung der Fluoreszenzintensitäten untersucht werden, ob die Innervierung des Hippokampus durch die Fasern bei Wildtyp und PRG-1 KO im gleichen Maß stattfindet. Außerdem sollte durch Lebendmessungen die Mobilität der einzelnen Fasern analysiert werden. Bei beiden Versuchen konnte festgestellt werden, dass das axonale Auswachsen gestört ist, wenn die Fasern aus einem PRG-1 defizienten EC stammten. Der Genotyp des Hippokampus war hierbei irrelevant und hatte auf das Verhalten

der einwachsenden Fasern keinen Einfluss. Das sprach dafür, dass PRG-1 das Auswachsen von Axonen erleichtert, wenn es in deren Ursprungszellen exprimiert wird.

Da in der Zwischenzeit neue Studien zeigten, dass PRG-1 bei erwachsenen Mäusen in der PSD zu finden und nicht präsynaptisch lokalisiert ist (Trimbuch et al., 2009), also gerade nicht auf den Axonen, wurden immunhistologische Färbungen angefertigt, um die Lokalisation in jungen Axonen zu überprüfen. Die ersten Versuche mit primären Neuronen führten zu keinem aussagekräftigen Ergebnis, da auf den MAP2-negativen Ausläufern nur ein sehr schwaches PRG-1 Signal zu finden war. In einem zweiten Anlauf wurden Ko-Kulturen angefertigt, die PRG-1 nur im EC und somit in den einwachsenden Axonen, falls vorhanden, exprimierten, aber nicht im hippokampalen Zielgewebe. Die Färbung dieser Kulturen mit einem Antikörper gegen PRG-1 zeigte eindeutig, dass die Axone und deren Wachstumskegels kein Signal für PRG-1 aufwiesen. Die Kontrolle, dass die Färbung an sich funktionierte, zeigte sich in derselben Ko-Kultur. Die Zellen innerhalb des ECs waren eindeutig positiv für PRG-1. Wenn PRG-1 also nicht auf einwachsenden Axonen lokalisiert ist, wie beeinflusst es dann das Auswachsverhalten dieser Axone? Wie lassen sich die Ergebnisse der ersten Versuche erklären?

## **D.2 Axonales Auswachsen und neuronale Aktivität**

Trimbuch et al. konnten zeigen, dass die PRG-1 KO Maus im Alter von drei Wochen spontane konvulsive Anfälle aufweist. Messungen der spontanen Vesikelfreisetzung ergab eine signifikant höhere mEPSC Frequenzen für PRG-1 KO Mäuse als für Wildtyp Mäuse (Trimbuch et al., 2009). Es wird angenommen, dass PRG-1 die glutamaterge Signaltransduktion von der postsynaptischen Seite aus reguliert, indem es die LPA Konzentration im synaptischen Spalt durch einen nicht-enzymatischen Aufnahme-Mechanismen senkt. Im umgekehrten Fall also scheint das Fehlen von PRG-1 die Menge an LPA an der Synapse zu erhöhen. An hippokampalen Neuronen konnte gezeigt werden, dass vermehrtes LPA zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziums ( $[Ca^{2+}]_i$ ) führt. Die Tatsache, dass dieser Effekt von Glutamat Rezeptor Antagonisten aufgehoben werden konnte, lässt darauf schließen, dass der Transmitter Glutamat eine Rolle bei dem beobachteten Effekt spielt (Holtsberg et al., 1997). Der Effekt des Kalziumanstiegs konnte vor kurzem auch direkt an präsynaptischen Terminalen beobachtet werden (persönliche Kommunikation, Olga Kieselmann, Charité). LPA induziert anscheinend die Aktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle an Axonendigungen, was zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration führt. Das führt zur vermehrten Exozytose von Vesikeln an der „Aktiven Zone“ der Präsynapse und somit zu einer Erhöhung der in den Vesikeln

befindlichen Neurotransmitter, wie z.B. Glutamat. Glutamat bindet an postsynaptischen spannungsabhängigen Ionenkanäle, von denen vor allem NMDA Rezeptoren und, abhängig von den Untereinheiten, AMPA Rezeptoren durchlässig sind für Kalzium-Ionen (Holtsberg et al., 1997). Es kommt also auch an der Postsynapse zu einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$ . LPA kann die extrazelluläre Glutamat Konzentration außerdem zusätzlich modifizieren, indem es die Aufnahme von Glutamat durch Astrozyten hemmt (Keller et al., 1996).

Es wird schon lange vermutet, dass die neuronale Aktivität eine entscheidende Rolle in der Bildung der Verbindungen innerhalb des Nervensystems spielt (Harris, 1981). Experimente an Helisoma konnten 1986 zum ersten Mal zeigen, dass die Generierung von Aktionspotentialen ausreichend ist, um das axonale Wachstum zu stoppen (Cohan und Kater, 1986). Schon damals vermuteten die Autoren, dass der Effekt von einer Veränderung der intrazellulären Ionenkonzentration, durch den vermehrten Einstrom von Kalzium in den Wachstumskegel, hervorgerufen wird (Cohan et al., 1987). Seitdem brachten eine Vielzahl von Publikationen die elektrische Aktivität und eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  mit dem axonalen und dendritischen Auswachsen in Verbindung, und zwar *in vivo* (Sretavan et al., 1988; Gomez und Spitzer, 1999; Uesaka et al., 2005) und *in vitro* (Kater et al., 1988; Fields et al., 1990; Tang et al., 2003; Ibarretxe et al., 2007; Yamada et al., 2008). Allerdings können Neurone unterschiedlich auf solche Parameter reagieren. Ein Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  bewirkt in den meisten bis heute untersuchten Neuronen eine Inhibierung des Neuritenwachstums. In anderen Neuronen allerdings, wie z.B. aus dem Diencephalon der Katze, bewirkt der Anstieg eine Steigerung des Neuritenwachstums (Connor, 1986). Schlussendlich kann die erhöhte  $[Ca^{2+}]_i$  auch überhaupt keinen Einfluss auf das Verhalten der Wachstumskegels haben, wie beispielsweise in Spinalganglienzellen oder sympathetische Neuronen des Huhns (Ivins et al., 1991; Garyantes and Regehr, 1992). Auch Glutamat selber wird durch die Regulation der Expression von Genen (Ghiani et al., 2006) und von sekundären Botenstoffen (Mattson et al., 1988) schon lange als Schlüsselmolekül in der Neuritenbildung betrachtet (Lipton und Kater, 1989; Zheng et al., 1996).

Der beobachtete Effekt des verminderten axonalen Auswachsens von den Neuronen einer PRG-1 KO Maus könnte also auf die Veränderung der glutamatergen Transmission zurückzuführen sein. Die Tatsache, dass die Veränderung in der PRG-1 defizienten Maus an der postsynaptischen Seite und somit am Dendritenbaum der Neurone lokalisiert ist, spricht allerdings gegen einen Effekt auf das Axon desselben Neurons. Da Studien zeigen konnten, dass Wachstumskegels ihre Chemotaxis beibehalten, auch wenn sie von dem Zellkörper getrennt sind (Campbell und Holt, 2001; Ming et al., 2002), ist das axonale Auswachsen anscheinend spezifisch von der Umgebung des Wachstumskegels abhängig. In dieser Arbeit gemachte Beobachtungen sprechen allerdings wiederum gegen eine solche Spezifität, da die Axone aus dem EC in dem Ko-Kultur-Modell durch die mit Glutamat angereicherter

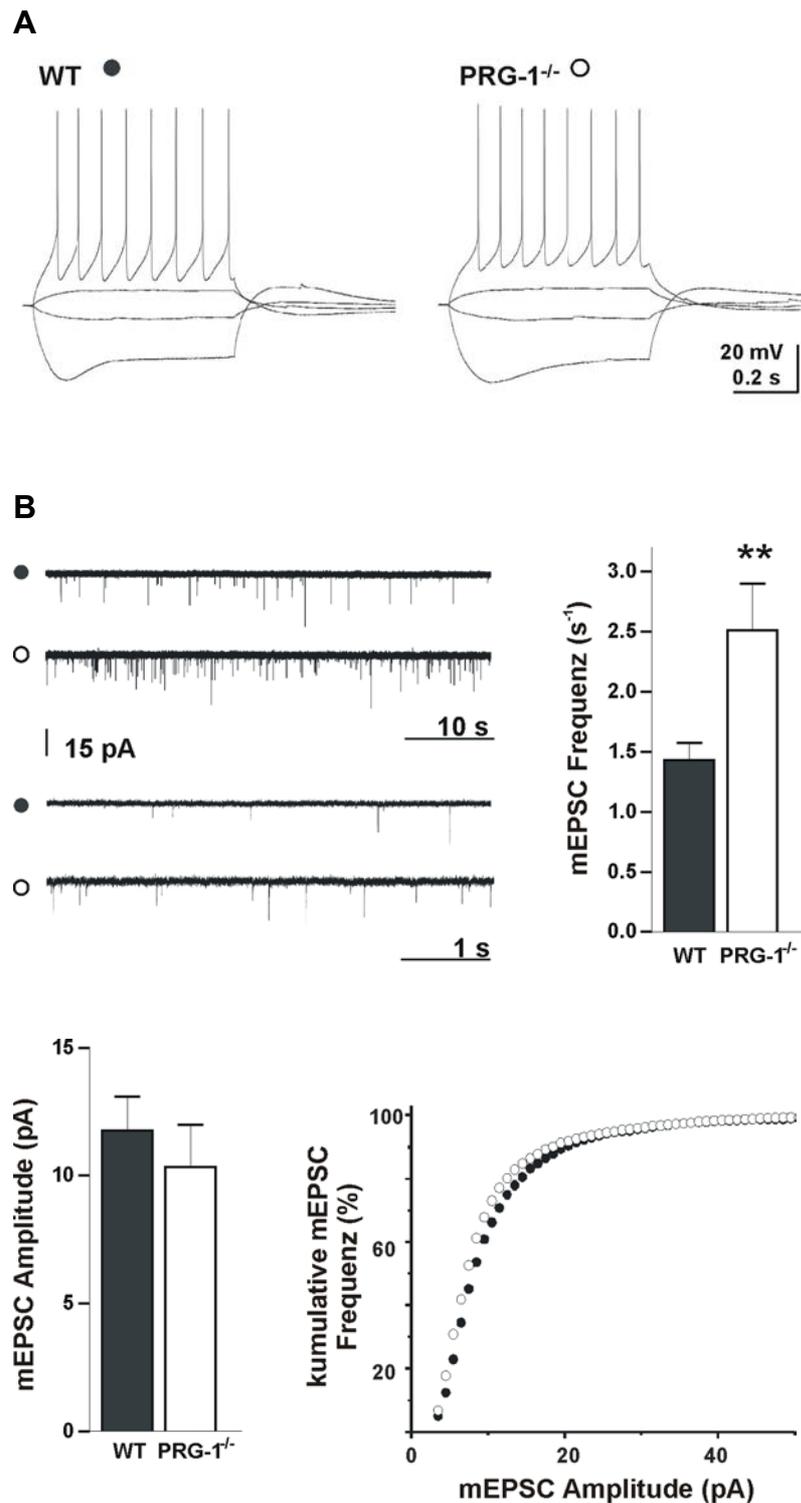
Umgebung von einem PRG-1 defizienten Hippokampus nicht beeinflusst wurden. Wildtyp Axone wurden in ihrer Geschwindigkeit nicht beeinträchtigt und die schon gehemmten PRG-1 defizienten Fasern wurden nicht noch langsamer.

Der Effekt scheint also tatsächlich von den Ereignissen zu kommen, die an der somatodendritischen Region passieren. Neue Experimente haben gezeigt, dass die fokale Applikation von Glutamat an den Zellkörper eine Inhibierung des axonalen Wachstums derselben Zelle nach sich zieht (Ryan et al., 2007; Yamada et al., 2008). Yamada et al. konnten außerdem zeigen, dass die direkte Zugabe von Glutamat zu Axonterminalen keinerlei Effekt hatte auf das Verhalten der axonalen Wachstumskegels. Sie zeigten, dass die Applikation von Glutamat an der somatodendritischen Region dort zu einem Anstieg von Kalzium führt, der sich durch die gesamte Zelle bis hin zum Wachstumskegel fortsetzt und es dann dort zur einer Retraktion des Axons kommt (Yamada et al., 2008).

### **D.3 Die PRG-1 KO Maus erfüllt die Voraussetzungen für die Theorie des geringeren Auswachsens durch mehr Input**

#### **D.3.1 PRG-1 KO besitzt eine erhöhte mEPSC Frequenz**

Voraussetzung für die Theorie, dass das axonale Auswachsen in der PRG-1 KO Maus aufgrund einer gestörten neuronalen Aktivität reduziert ist, ist eine erhöhte Erregbarkeit in jungen Tieren, wie man sie schon in der CA1 Region von Adulten festgestellt hat (Trimbuch et al., 2009). Außerdem musste überprüft werden, ob diese Übererregbarkeit auch im Bereich des lateralen entorhinalen Kortex zu finden ist, der Region, aus der die in dieser Arbeit beobachteten Axone stammten. Der hervorstechendste Effekt in der adulten PRG-1 KO Maus war die Erhöhung der spontanen Vesikelfreisetzung an glutamatergen Synapsen (mEPSC). Diese Messung wurde, in Kooperation mit AG Strauß am Institut für Zell- und Neurobiologie, an Gehirnschnitten von jungen (P6+/-1) PRG-1 defizienten und WT Tieren gemacht. Es zeigte sich, dass auch in diesem Fall die mEPSC Frequenz bei der PRG-1 KO Maus im Gegensatz zur Wildtyp Maus erhöht war (PRG-1 KO,  $2.51 \pm 0.39$  Hz,  $n = 11$ ; WT,  $1.41 \pm 0.13$  Hz,  $n = 9$ ;  $P < 0.01$ ; Abbildung 44 B). Wie auch bei den adulten Tieren konnte trotz dieser Unterschiede in der Erregbarkeit kein Unterschied in den intrinsischen Eigenschaften, wie Ruhemembranpotential, Eingangswiderstand, Amplitude und Schwellenwert der Aktionspotentiale gefunden werden (Abbildung 44 A). Die Erhöhung der mEPSC Frequenz scheint also die einzige elektrophysiologisch veränderte Komponente zu sein.



**Abbildung 45:** Die mEPSC Frequenz ist in jungen PRG-1 defizienten Tieren erhöht. Die Versuche wurden in Kooperation mit AG Strauß gemacht. Die Messungen erfolgten in Schicht II/III vom entorhinalen Kortex. **A)** Die intrinsischen Eigenschaften wie Membranpotential, Eingangswiderstand, Amplitude und Schwellenwert der Aktionspotentiale waren zwischen Wildtyp und PRG-1 KO nicht unterschiedlich. **B)** PRG-1 KO Tiere hatten eine erhöhte mEPSC Frequenz, wobei die Amplitude nicht verändert war.

### **D.3.2 Die Neurone des ECs reagieren auf Glutamat**

Wie schon erwähnt, konnten Yamada et al. zeigen, dass die Applikation von Glutamat zu den Zellkörpern sich auf das Verhalten der Axone auswirken kann. Die Experimente wurden an Körnerzellen des DGs durchgeführt. Gleichzeitig bemerkten sie, dass hippocampale Pyramidenzellen zu so einer Reaktion auf Glutamat nicht in der Lage waren. Sie vermuteten, dass die Körnerzellen spezifisch dafür ausgestattet waren, mit Glutamat in so einer Weise zu reagieren.

Um zu überprüfen, ob das hier angewandte System auf eine erhöhte Menge an Glutamat reagieren kann, wurden die Axone aus Wildtyp Tieren in einer Lebendmessung unter Zugabe von 0.5 mM Glutamat beobachtet. Es zeigte sich, dass die Axone langsamer wurden. Es war mit dem in diesen Untersuchungen verwendeten System nicht möglich, Glutamat gezielt auf den EC zu geben. Aber wie schon in D.2 erwähnt, wurden die Axone durch eine glutamatreiche Umgebung eines PRG-1 defizienten Hippokampus nicht beeinträchtigt. Die axonalen Ursprungszellen schienen also in der Lage zu sein, auf Glutamat derartig zu reagieren, dass deren Axone im Auswachsen gehemmt werden.

### **D.3.3 Die Blockierung von Ionenkanäle stellt bei PRG-1 defizienten Kulturen den Phänotypen des Wildtypus wieder her**

Nach angenommener Hypothese wird durch das fehlende PRG-1 die LPA Konzentration im Gehirn erhöht, die wiederum die Kalziumkonzentration erhöht, was auf verschiedenen Wegen das Verhalten von Neuriten beeinflussen kann. Der Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  kann zum einen durch die Freisetzung von intrazellulären Kalziumspeicher erfolgen (Lipscombe et al., 1988) oder durch das Einströmen an kalziumdurchlässigen Kanälen an der Zellmembran. Sollte der von mir hier beobachtete Effekt wirklich von erhöhtem Kalzium abhängig sein, dann sollte eine Blockierung der Freisetzung von Kalzium und/oder der durchlässigen Rezeptoren das Ergebnis beeinflussen. In dieser Arbeit wurden nur die Kalziumkanäle blockiert. Diese Inhibierung führte zu einem normalen Auswachsen der Axone in PRG-1 defizienten Explanaten. Der Effekt ist also tatsächlich aktivitätsabhängig. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass das axonale Auswachsen in PRG-1 KO Tieren abhängig von der neuronalen Aktivität der Zellen ist.

#### D.4 Axonales Verzweigungsmuster ('Axon branching')

Die Experimente mit den Ko-Kulturen ergaben, dass der entorhinale Fasertrakt, der den Hippokampus innervierte, in seiner Dichte vermindert war, wenn die Axone aus einem PRG-1 defizienten EC stammten. Interessanterweise projizierten alle Fasern in den hier angefertigten Ko-Kulturen in die richtige Schicht des Hippokampus, unabhängig von den verschiedenen Genotypen und Kombinationen. Es schien, dass nur das Auswachsen an sich gestört war und nicht die eigentliche Wegfindung. Auch die mikroskopische Analyse des Perforant Path in Hirnschnitten aus adulten Mäusen zeigte einen signifikanten Unterschied in der Anzahl der Fasern zwischen WT und PRG-1 KO (persönliche Kommunikation, Johannes Vogt, Charité). Das geringere Auswachsen scheint während der Entwicklung also nicht 'aufgeholt' zu werden.

Da die Größe des ECs in PRG-1 KO Mäusen nicht reduziert ist (persönliche Kommunikation, Johannes Vogt, Charité), ist eine Verminderung der Zellzahl unwahrscheinlich. Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die PRG-1 defizienten Fasern in ihrer Länge reduziert sind, könnte es sein, dass die geringere Dichte der auswachsenden Axone auf weniger verzweigte Axone zurückzuführen ist.

Die korrekte Entwicklung des neuronalen Netzwerkes hängt nicht nur von der Vorwärtsbewegung der terminalen Wachstumskegels ab, sondern auch von der lokalen Regulation der Axonverzweigungen. Die Entstehung, die Eliminierung und auch die Stabilität von axonalen und dendritischen Ausläufern wird ebenfalls durch Kalzium und die neuronale Aktivität reguliert (Konur und Ghosh, 2005). Experimente mit organotypischen Schnittkulturen aus der Maus zeigten, dass die neuronale Aktivität die in frühen Entwicklungsstadien entstehende Verzweigungen von kortikalen Neuronen reguliert. Die Bildung dieser Axonverzweigungen konnte *in vitro* durch TTX und AMPA Rezeptor Blocker inhibiert werden (Uesaka et al., 2005). Auch retinale Ganglienzellen der Katze, die TTX ausgesetzt waren, bildeten abnorme Strukturen von terminalen Verzweigungen aus, was den Schluss zuließ, dass diese Entwicklung aktivitätsabhängig ist. Im Gegensatz zu dem vorherigen Experiment allerdings, bei dem die Verzweigungen bei einer Aktivitätsblockierung reduziert waren, wurden die Axone hier mit TTX viel komplexer (Sretavan et al., 1988). Ähnliche Beobachtungen konnten an der Qaulquappe gemacht werden. Eine akute Blockade der retinalen Aktivität führte zu einer Steigerung der axonalen Komplexität (Cohen-Cory, 1999).

Die Vermutung, dass PRG-1 defiziente Axone weniger komplex ausgebildet werden, muss noch genauer untersucht werden. Axonales branching lässt sich gut in sehr jungen primären Neuronen untersuchen, da das Axon gut erkennbar ist und noch nicht von komplexen Dendritenbäumen verdeckt wird. So ein System wäre für weitere Experimente mit der PRG-1

defizienten Maus nicht sinnvoll, da synaptische Kontakte in primären Zellen erst in der zweiten Woche *in vitro* gebildet werden. Nach unserer Theorie sind diese Verbindungen aber Voraussetzung für den Effekt des geringeren und verlangsamten Wachstums in der PRG-1 KO Maus. Eine bessere Möglichkeit wäre, *in vivo* einzelne Zellen mit EGFP zu markieren und diese dann in Gehirnschnitten zu untersuchen.

## **D.5 PRG-1 induziert die Bildung von Filopodien**

Schon für ein anderes Mitglied der PRGs, PRG-3 oder LPR1, wurde berichtet, dass die Überexpression in nicht-neuronalen Zellen (HeLa und Cos7) (Sigal et al., 2007) und in neuronalen Zellen (N1E-115) (Savaskan et al., 2004) die Bildung von langen, dünnen, Aktinreichen Strukturen, sogenannten Filopodien, hervorruft. In neueren Studien konnten ähnliche Beobachtungen für PRG-5 gemacht werden. Wird das Molekül in Neuronen überexprimiert, induziert es die Bildung, wird es herunterreguliert, verhindert es die Bildung von Filopodien (Broggini et al.). Filopodien gelten als die Vorläufer von dendritischen Spines (Ziv und Smith, 1996; Yoshihara et al., 2009). Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von PRG-1 in nicht-neuronalen HEK293-Zellen die Bildung von Filopodien verursacht. Im Zuge einer Bachelorarbeit am Institut für Zell- und Neurobiologie (M. Pockrand, TFH Berlin, 2008) wurden weitere Versuche mit verschiedenen PRG-1 Konstrukten durchgeführt. Einer davon war die Transfektion der HEK293-Zellen mit einem mutierten PRG-1, das am Aminosäurerest 253 eine Substitution von Histidin nach Lysin aufwies (H253K). Dieser konservierte Rest ist an der Substraterkennung von den aktiven Mitgliedern der LPP Familie beteiligt und eine Mutation resultiert in einem inaktiven Enzym (Sigal et al., 2005). Wie auch schon Sigal et al. 2007 analog für PRG-3 berichtete, konnte die Transfektion mit dieser PRG-1 Mutante keine Formation der Filopodien mehr induzieren. Das mutierte PRG-3 konnte nicht mehr in der Zellmembran lokalisiert werden, was Sigal zu dem Schluss kommen ließ, dass die Bindung von PRGs an ein bis jetzt unbekanntes Lipid essentiell ist für den Transport des Moleküls in die Membran und einer Induzierung der Filopodien. Dies könnte auch für PRG-1 der Fall sein.

## **D.6 PRG-1 scheint an der Bildung von Spines, aber nicht an der von Synapsen beteiligt zu sein**

Spines gelten in Neuronen als wichtigste Orte der exzitatorischen synaptischen Übertragung. Die Tatsache, dass PRG-1 defiziente Tiere in allen Altersstufen weniger Spines aufweisen

als Wildtypen, lässt die Frage aufkommen, ob die Zahl der Synapsen ebenfalls beeinträchtigt ist. In früheren Arbeiten über PRG-1 konnte gezeigt werden, dass die klassische molekulare Maschinerie der Synapse in der PRG-1 KO Maus sich von der in der Wildtyp Maus nicht unterscheidet. Immunhistologische Fluoreszenzfärbungen und Western Blot Daten zeigten keinen Unterschied in der Expression von präsynaptischen Markern wie Synaptophysin, Vglut1, Vgat und GAD67, wie auch keine Unterschiede in den postsynaptischen Markern wie den AMPAR Untereinheiten (GluR1, GluR2/3, GluR4), PSD-95 und den NMDAR Untereinheiten NR1 und NR2A/B. Auch war das Verhältnis AMPA/NMDA nicht verändert (Trimbuch et al., 2009). All diese Tatsachen sprechen gegen eine Verminderung der Synapsen in der PRG-1 KO Maus. Außerdem existieren Studien, die zeigen, dass Synapsen bei einem Verlust der Spines beibehalten werden können (Hasbani et al., 2001).

Fiala et al. berichtete 1998, dass 53 % der synaptischen Kontakte in den ersten postnatalen Wochen direkt am dendritischen Schaft entstehen (Cotman et al., 1973; Schwartzkroin und Kunkel, 1982; Steward und Falk, 1991; Boyer et al., 1998; Fiala et al., 1998). Ultrastrukturelle Analysen ergaben, dass PRG-1 in diesen frühen Stadien an den dendritischen Membranen exprimiert wird und in der PSD der zu diesem Zeitpunkt nur vereinzelt vorkommenden Spine Synapsen (persönliche Kommunikation, Johannes Vogt, Charité).

Bei P12 befindet sich ein kleinerer, aber immer noch erheblicher Teil (31 %) der Synapsen am dendritischen Schaft (Fiala et al., 1998). Interessanterweise ist in den ultrastrukturellen Aufnahmen dieses Alters zu erkennen, dass das PRG-1 Signal, das punktförmig erscheint, in der dendritischen Membran in einem Verhältnis von 1:5 steht mit dem PRG-1 Signal in den Spines (persönliche Kommunikation, Johannes Vogt, Charité), was dem Verhältnis von Schaft Synapsen gegen Spine Synapsen in diesem Alter entspricht (Pokorny und Yamamoto, 1981). Diese Daten sprechen für einen Wechsel der PRG-1 Expression vom dendritischen Schaft in die Spines, wo PRG-1 in der PSD lokalisiert ist. Schon seit langen wird angenommen, dass sich Spines im Hippokampus durch einen Auswuchsprozess aus Schaft Synapsen bilden (Cotman et al., 1973; Pokorny und Yamamoto, 1981).

Diese Daten sprechen für ein Szenario, in dem die frühe Entwicklung der Synapsen bei Wildtypen und PRG-1 KO gleich abläuft. Zu einem späteren Zeitpunkt aber ist die Ausbildung der Spines aus der Membran bei der PRG-1 KO Maus gestört und die Synapsen verbleiben hier als Schaftsynapsen. Die Tatsache, dass bei P12 die Spines in der PRG-1 KO Maus größer sind als beim Wildtyp, könnte auch für eine gestörte Ausbildung sprechen. Die Bildung von ausgereiften Spines aus der Membran läuft oft über lange Filopodien als Zwischenstufe (Fiala et al., 1998). Wenn in der PRG-1 defizienten Maus mehr solcher Zwischenstufen vorhanden sind, da sie in der Entwicklung zurückliegt, könnte sich das auf die Größe der Spineflächen auswirken. All das würde für eine direkte Beteiligung von PRG-1 an dem Prozess der Spinebildung sprechen.

Es gibt Hinweise, dass eine Umgestaltung des Aktinzytoskeletts an der Bildung und Eliminierung von dendritischen Filopodien und Spines beteiligt ist (Ethell and Pasquale, 2005). So könnte im Fall von PRG-1 der lange zytoplasmatische C-Terminus auf eine bis dato unbekannte Weise auf Aktin-regulierende Proteine wirken. Die Überexpression eines PRG-1 Konstruktes ohne den C-Terminus in HEK293-Zellen (M. Pockrand, Bachelorarbeit TFH Berlin, 2008) zeigte nicht nur weniger Filopodien, sondern auch eine veränderte Morphologie von diesen. Die Enden der Filopodien wiesen im hohen Maße Auflösungserscheinungen auf. Andererseits konnte die Transfektion nur mit dem C-Terminus keine Erhöhung der Filopodienzahl induzieren. Das C-terminale Ende scheint also eine notwendige, aber keine ausreichende Funktion in der Bildung und Aufrechterhaltung der Filopodien darzustellen.

## D.7 Veränderungen in Spines nach einer Deafferenzierung

Viele der Moleküle, die während der Entwicklung an der Regulation der Spinebildung beteiligt sind, haben auch wieder eine Funktion bei der Umgestaltung der Spines (Ethell und Pasquale, 2005). Eine Umgestaltung in maturaen Neuronen wird zu einem wichtigen Punkt nach einer Verletzung des Gehirns. So führt eine Durchtrennung des entorhinalen Fasertraktes, dem PP, im adulten Gehirn zu einer Blockierung der Informationsleitung und zum Verlust der Axone im Hippokampus. Verbleibende Fasern, die durch diesen Eingriff nicht geschädigt wurden, sprießen in diese deafferentierte Region und ersetzen die verloren gegangenen Afferenzen des PP (Frotscher et al., 1997). Diese neu gebildeten Kollateralen initiieren dann das Auftreten von Membranausstülpungen an den Dendriten der Zielzellen (Jontes et al., 2000) und bilden neue Synapsen, die diejenigen ersetzen, die durch die Läsion verloren gegangen sind (Frotscher et al., 1997). Die Tatsache, dass PRG-1 nach einer Läsion hochreguliert wird (Brauer et al., 2003) ist ein weiteres starkes Indiz für die Beteiligung von PRG-1 an der Spinesbildung.

Es konnte gezeigt werden, dass nach einer Verletzung und der darauffolgenden Eliminierung des Axons, mit dem die synaptischen Kontakte eingegangen wurden, die Spines an den Dendriten erst mal verschwinden (Cheng et al., 1997). Da sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine Verminderung des axonalen Auswachsens in der PRG-1 KO Maus beobachtet wurde, liegt die Vermutung nahe, dass der Verlust und die Verminderung der Spines an der deutlich verringerten Anzahl an Axonen liegt, die perpendikular die Dendritenbäume kreuzen. Dieser Verdacht konnte durch die *in utero* Experimente ausgeschlossen werden. In solchen Versuchen wurde ein PRG-1 deletiertes Neuron geschaffen, das in einer Wildtyp Umgebung liegt. Das bedeutet, die ankommenden Afferenzen sind nicht beeinträchtigt.

Trotzdem konnte in diesem Neuron eine starke Reduktion in der Anzahl der Spines beobachtet werden. Der Wert war sogar fast identisch mit dem Wert in der konstitutiven PRG-1 KO Maus.

Mit dem gleichen Experiment konnte darüber hinaus ausgeschlossen werden, dass der Verlust der Spines auf die konvulsiven Anfälle der PRG-1 defizienten Maus zurückzuführen ist. Die *in utero* behandelten Tiere wiesen keinerlei solcher Anfälle auf und waren auch in den elektrophysiologischen Messungen unauffällig (Trimbuch et al., 2009).

## D.8 Synaptische Aktivität und Spineverlust

Wie oben erwähnt, gibt es viele Studien über die Veränderung in der Spinebeschaffenheit nach einer Läsion. Die Regulation der Spinedichte und die Modifizierung der Morphologie scheint eine Reaktion auf eine verminderte Innervierung und der darauf folgenden Änderung in der synaptischen Aktivität zu sein (Kirov und Harris, 1999). Diese Änderung der synaptischen Aktivität ist ein interessanter Aspekt, da die PRG-1 KO Maus eine Veränderung in dieser aufweist. In jungen wie in alten Tieren ist eine Übererregbarkeit festzustellen, die sich auch mindestens auf zwei Regionen im Gehirn bezieht (CA und EC).

Im vorderen Kortex der Ratte konnte eine Erhöhung der Spinedichte beobachtet werden, nachdem der Nucleus basalis magnocellularis (NBM) geschädigt wurde. Die Autoren vermuteten, dass durch den verminderten cholinergen Input die Aktivität im vorderen Kortex gesenkt wurde und so die Steigerung in der Anzahl der Spines zu erklären wäre (Harmon und Wellman, 2003). Des weiteren konnte gezeigt werden, dass die Blockierung der synaptischen Aktivität die Spinedichte an CA Pyramidenzellen erhöht (Kirov und Harris, 1999). Auch die Aktivierung von Glutamat Rezeptoren scheint die Bildung und die Dynamik der Spines zu beeinflussen. AMPA Rezeptoren spielen eine Rolle im Wachstum und der Erhaltung der Spines (McKinney et al., 1999; Passafaro et al., 2003) und die Aktivierung von NMDA Rezeptoren hat eine rapide Retraktion der Spines zur Folge (Halpain et al., 1998; Hasbani et al., 2001; Lippman und Dunaevsky, 2005). Wieder andere Experimente demonstrierten einen starken Rückgang von dendritischen Wachstumskegeln nach der Applikation von Glutamat.

PRG-1 scheint über den LPA<sub>2</sub> Rezeptor regulierend auf die exitatorische Transmission zu wirken. Es wird vermutet, dass das Fehlen von PRG-1 zu einer erhöhten Transmitterfreisetzung führt und somit zu einer Erhöhung von Glutamat an der postsynaptischen Seite (Trimbuch et al., 2009; persönliche Kommunikation, Olga Kieselmann, Charité). Das würde dafür sprechen, dass der Verlust der Spines in der PRG-1 KO Maus auf die erhöhte synaptische Aktivität zurückzuführen ist. Die Tatsache, dass

primäre Neurone aus der LPA<sub>2</sub>/PRG-1 doppelt defizienten Maus, die keine Änderung in der synaptischen Aktivität mehr aufweist (Trimbuch et al., 2009), keine Veränderung in der Spinedichte zeigen, unterstützt diese Annahme. In der Theorie erhöht das Fehlen von PRG-1 die Konzentration an LPA, was wiederum zu einer Erhöhung des Kalziumeinstroms führt. Seltsamerweise enthält das Medium für primäre Neurone kein LPA, und trotzdem wird der Effekt der Spinereduktion in PRG-1 defizienten Neuronen beobachtet. Mehr noch, eine Überexpression von PRG-1 erhöht sogar die Spinedichte. Auch die Bildung von Filopodien in nicht-neuronalen HEK293-Zellen spricht gegen einen aktivitätsabhängigen Effekt, da diese zur Ausbildung von Synapsen wie bei Neuronen nicht befähigt sind.

## C.9 Fazit und Ausblick

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Rolle von PRG-1 am axonalen Auswachsen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass PRG-1 defiziente Axone tatsächlich in ihrer Entwicklung gestört sind. Allerdings wurde die ursprüngliche Vermutung von PRG-1 als Leitmolekül auf dem Wachstumskegel widerlegt. Die Lokalisation von PRG-1 in der PSD und nicht auf den Axonen war ein erstes Indiz für eine andere als die ursprünglich vermutete Funktion. Tatsächlich scheint die veränderte synaptische Transmission in der PRG-1 defizienten Maus den Effekt des verringerten und verlangsamten Auswachsens zu induzieren. Die Aktivitätsabhängigkeit konnte mit Versuchen, in denen eine intrazelluläre Kalziumerhöhung verhindert wurde, bestätigt werden.

Im zweiten Teil wurde der Einfluss von PRG-1 auf die Bildung von dendritischen Spines untersucht. Die Spinedichte war in allen untersuchten Konditionen in der PRG-1 KO Maus um fast die Hälfte geringer als in der Wildtyp Maus. Die Spinegröße war bis auf zwei Ausnahmen nicht verändert. *In utero* und *in vitro* Untersuchungen sprechen für eine direkte Beteiligung von PRG-1 an der Ausbildung des Spines aus der Dendritenmembran. Analysen der LPA<sub>2</sub>/PRG-1 doppelt defizienten Maus sprechen für einen aktivitätsabhängigen Effekt.

Für beide Prozesse, axonales Auswachsen und die Bildung von Spines und Filopodien, sind eine Neuordnung und Umgestaltung von Aktinfilamenten und auch Mikrotubuli essentiell. Das spricht für einen Einfluss von PRG-1 auf Aktin-regulierende und -bindende Proteine. Die genaue Interaktion und die involvierten Signalwege gilt es in Zukunft näher zu betrachten. Der PI3K/Akt Signalweg z. B. wurde als wichtig beschrieben für Neuritenwachstum, synaptische Plastizität und Ausbildung von Dendritenbäumen. Auch der MAPK/ERK Signalweg ist für seine Auswirkung auf Zytoskelett-Proteine bekannt. Die Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin abhängigen Protein Kinasen spielen eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der neuronalen Morphologie. Vor allem CaMKI scheint wichtig zu sein für Wachstumskegel

Mobilität (Wayman et al., 2004), Neuritenwachstum (Schmitt et al., 2004; Uboha et al., 2007), aktivitätsabhängige Bildung von Dendriten (Wayman et al., 2006; Takemoto-Kimura et al., 2007) und Stabilisierung von Spines (Saneyoshi et al., 2008). Interessant im Zusammenhang mit PRG-1 könnte v. a. die CaMKK-CamKI $\alpha$  und CaMKK – CaMKI $\gamma$ , da sie cytoplasmatisch lokalisiert sind und von dort auf das axonale Wachstum Einfluss nehmen.

## E Literaturverzeichnis

- Ahmad FJ, Echeverri CJ, Vallee RB, Baas PW (1998) Cytoplasmic dynein and dynactin are required for the transport of microtubules into the axon. *J Cell Biol* 140:391-401.
- Anliker B, Chun J (2004) Lysophospholipid G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 279:20555-20558.
- Atwal JK, Massie B, Miller FD, Kaplan DR (2000) The TrkB-Shc site signals neuronal survival and local axon growth via MEK and P13-kinase. *Neuron* 27:265-277.
- Bernhardt R, Matus A (1984) Light and electron microscopic studies of the distribution of microtubule-associated protein 2 in rat brain: a difference between dendritic and axonal cytoskeletons. *J Comp Neurol* 226:203-221.
- Bertoni-Freddari C, Giuli C, Pieri C, Paci D (1986) Age-related morphological rearrangements of synaptic junctions in the rat cerebellum and hippocampus. *Arch Gerontol Geriatr* 5:297-304.
- Biernat J, Wu YZ, Timm T, Zheng-Fischhofer Q, Mandelkow E, Meijer L, Mandelkow EM (2002) Protein kinase MARK/PAR-1 is required for neurite outgrowth and establishment of neuronal polarity. *Mol Biol Cell* 13:4013-4028.
- Boyer C, Schikorski T, Stevens CF (1998) Comparison of hippocampal dendritic spines in culture and in brain. *J Neurosci* 18:5294-5300.
- Brandt N, Franke K, Rasin MR, Baumgart J, Vogt J, Khrolev S, Hassel B, Pohl EE, Sestan N, Nitsch R, Schumacher S (2007) The neural EGF family member CALEB/NGC mediates dendritic tree and spine complexity. *EMBO J* 26:2371-2386.
- Brauer AU, Nitsch R (2008) Plasticity-related genes (PRGs/LRPs): a brain-specific class of lysophospholipid-modifying proteins. *Biochim Biophys Acta* 1781:595-600.
- Brauer AU, Savaskan NE, Kuhn H, Prehn S, Ninnemann O, Nitsch R (2003) A new phospholipid phosphatase, PRG-1, is involved in axon growth and regenerative sprouting. *Nat Neurosci* 6:572-578.
- Bray D (1973) Branching patterns of individual sympathetic neurons in culture. *J Cell Biol* 56:702-712.
- Bray D, Chapman K (1985) Analysis of microspike movements on the neuronal growth cone. *J Neurosci* 5:3204-3213.
- Brindley DN (2004) Lipid phosphate phosphatases and related proteins: signaling functions in development, cell division, and cancer. *J Cell Biochem* 92:900-912.
- Brindley DN, Waggoner DW (1998) Mammalian lipid phosphate phosphohydrolases. *J Biol Chem* 273:24281-24284.
- Broggini T, Nitsch R, Savaskan NE Plasticity-related gene 5 (PRG5) induces filopodia and neurite growth and impedes lysophosphatidic acid- and nogo-A-mediated axonal retraction. *Mol Biol Cell* 21:521-537.
- Burwell RD, Witter MP, Amaral DG (1995) Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: a review of the neuroanatomical literature and comparison with findings from the monkey brain. *Hippocampus* 5:390-408.
- Campbell DS, Holt CE (2001) Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron* 32:1013-1026.
- Caroni P (1997) Overexpression of growth-associated proteins in the neurons of adult transgenic mice. *J Neurosci Methods* 71:3-9.
- Chedotal A, Del Rio JA, Ruiz M, He Z, Borrell V, de Castro F, Ezan F, Goodman CS, Tessier-Lavigne M, Sotelo C, Soriano E (1998) Semaphorins III and IV repel hippocampal axons via two distinct receptors. *Development* 125:4313-4323.
- Chen H, Chedotal A, He Z, Goodman CS, Tessier-Lavigne M (1997) Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III. *Neuron* 19:547-559.
- Cheng HW, Rafols JA, Goshgarian HG, Anavi Y, Tong J, McNeill TH (1997) Differential spine loss and regrowth of striatal neurons following multiple forms of deafferentation: a Golgi study. *Exp Neurol* 147:287-298.

- Cline HT (2001) Dendritic arbor development and synaptogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 11:118-126.
- Cohan CS, Kater SB (1986) Suppression of neurite elongation and growth cone motility by electrical activity. *Science* 232:1638-1640.
- Cohan CS, Connor JA, Kater SB (1987) Electrically and chemically mediated increases in intracellular calcium in neuronal growth cones. *J Neurosci* 7:3588-3599.
- Cohen-Cory S (1999) BDNF modulates, but does not mediate, activity-dependent branching and remodeling of optic axon arbors in vivo. *J Neurosci* 19:9996-10003.
- Colamarino SA, Tessier-Lavigne M (1995) The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons. *Cell* 81:621-629.
- Connor JA (1986) Digital imaging of free calcium changes and of spatial gradients in growing processes in single, mammalian central nervous system cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:6179-6183.
- Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173:33-38.
- Cotman CW, Matthews DA, Taylor D, Lynch G (1973) Synaptic rearrangement in the dentate gyrus: histochemical evidence of adjustments after lesions in immature and adult rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70:3473-3477.
- Dailey ME, Smith SJ (1996) The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J Neurosci* 16:2983-2994.
- De Paola V, Arber S, Caroni P (2003) AMPA receptors regulate dynamic equilibrium of presynaptic terminals in mature hippocampal networks. *Nat Neurosci* 6:491-500.
- Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 8:1454-1468.
- Ethell IM, Pasquale EB (2005) Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling. *Prog Neurobiol* 75:161-205.
- Feng G, Mellor RH, Bernstein M, Keller-Peck C, Nguyen QT, Wallace M, Nerbonne JM, Lichtman JW, Sanes JR (2000) Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* 28:41-51.
- Fiala JC, Spacek J, Harris KM (2002) Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain Res Brain Res Rev* 39:29-54.
- Fiala JC, Feinberg M, Popov V, Harris KM (1998) Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *J Neurosci* 18:8900-8911.
- Fields RD, Neale EA, Nelson PG (1990) Effects of patterned electrical activity on neurite outgrowth from mouse sensory neurons. *J Neurosci* 10:2950-2964.
- Forscher P, Smith SJ (1988) Actions of cytochalasins on the organization of actin filaments and microtubules in a neuronal growth cone. *J Cell Biol* 107:1505-1516.
- Forster E, Zhao S, Frotscher M (2006) Laminating the hippocampus. *Nat Rev Neurosci* 7:259-267.
- Frotscher M, Heimrich B, Deller T (1997) Sprouting in the hippocampus is layer-specific. *Trends Neurosci* 20:218-223.
- Fukata Y, Itoh TJ, Kimura T, Menager C, Nishimura T, Shiromizu T, Watanabe H, Inagaki N, Iwamatsu A, Hotani H, Kaibuchi K (2002) CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nat Cell Biol* 4:583-591.
- Gahwiler BH (1981) Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 4:329-342.
- Gahwiler BH (1984) Development of the hippocampus in vitro: cell types, synapses and receptors. *Neuroscience* 11:751-760.
- Garyantes TK, Regehr WG (1992) Electrical activity increases growth cone calcium but fails to inhibit neurite outgrowth from rat sympathetic neurons. *J Neurosci* 12:96-103.
- Geraldo S, Gordon-Weeks PR (2009) Cytoskeletal dynamics in growth-cone steering. *J Cell Sci* 122:3595-3604.
- Ghiani CA, Lelievre V, Beltran-Parrasal L, Sforza DM, Malvar J, Smith DJ, Charles AC, Ferchmin PA, de Vellis J (2006) Gene expression is differentially regulated by neurotransmitters in embryonic neuronal cortical culture. *J Neurochem* 97 Suppl 1:35-43.

- Glumm R, Klötting A, Heimrich B (2002) Development of Axonal Projections in Cocultures of the Hippocampal Formation Visualized with  $\beta$ -Actin-gfp Transgenic Slices *Neuroembryology* 1:17-22.
- Goldberg JL (2003) How does an axon grow? *Genes Dev* 17:941-958.
- Gomez TM, Spitzer NC (1999) In vivo regulation of axon extension and pathfinding by growth-cone calcium transients. *Nature* 397:350-355.
- Gomez TM, Spitzer NC (2000) Regulation of growth cone behavior by calcium: new dynamics to earlier perspectives. *J Neurobiol* 44:174-183.
- Gordon JW, Chesa PG, Nishimura H, Rettig WJ, Maccari JE, Endo T, Seravalli E, Seki T, Silver J (1987) Regulation of Thy-1 gene expression in transgenic mice. *Cell* 50:445-452.
- Govek EE, Newey SE, Akerman CJ, Cross JR, Van der Veken L, Van Aelst L (2004) The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis. *Nat Neurosci* 7:364-372.
- Hall A (1994) Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol* 10:31-54.
- Halpain S, Hipolito A, Saffer L (1998) Regulation of F-actin stability in dendritic spines by glutamate receptors and calcineurin. *J Neurosci* 18:9835-9844.
- Harada A, Teng J, Takei Y, Oguchi K, Hirokawa N (2002) MAP2 is required for dendrite elongation, PKA anchoring in dendrites, and proper PKA signal transduction. *J Cell Biol* 158:541-549.
- Harmon KM, Wellman CL (2003) Differential effects of cholinergic lesions on dendritic spines in frontal cortex of young adult and aging rats. *Brain Res* 992:60-68.
- Harris KM (1999) Structure, development, and plasticity of dendritic spines. *Curr Opin Neurobiol* 9:343-348.
- Harris WA (1981) Neural activity and development. *Annu Rev Physiol* 43:689-710.
- Hasbani MJ, Schlieff ML, Fisher DA, Goldberg MP (2001) Dendritic spines lost during glutamate receptor activation reemerge at original sites of synaptic contact. *J Neurosci* 21:2393-2403.
- Hashimoto Y, Miyakawa H, Kudo Y, Inoue M (2004) 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) increases GABAA receptor-mediated spontaneous postsynaptic currents in the dentate granule cells of rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* 358:33-36.
- He Z, Tessier-Lavigne M (1997) Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 90:739-751.
- Hechler D, Nitsch R, Hendrix S (2006) Green-fluorescent-protein-expressing mice as models for the study of axonal growth and regeneration in vitro. *Brain Res Rev* 52:160-169.
- Hering H, Sheng M (2001) Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nat Rev Neurosci* 2:880-888.
- Holtsberg FW, Steiner MR, Furukawa K, Keller JN, Mattson MP, Steiner SM (1997) Lysophosphatidic acid induces a sustained elevation of neuronal intracellular calcium. *J Neurochem* 69:68-75.
- Hutchins BI, Kalil K (2008) Differential outgrowth of axons and their branches is regulated by localized calcium transients. *J Neurosci* 28:143-153.
- Ibarretxe G, Perrais D, Jaskolski F, Vimeney A, Mulle C (2007) Fast regulation of axonal growth cone motility by electrical activity. *J Neurosci* 27:7684-7695.
- Irie F, Yamaguchi Y (2002) EphB receptors regulate dendritic spine development via intersectin, Cdc42 and N-WASP. *Nat Neurosci* 5:1117-1118.
- Ivins JK, Raper JA, Pittman RN (1991) Intracellular calcium levels do not change during contact-mediated collapse of chick DRG growth cone structure. *J Neurosci* 11:1597-1608.
- Jontes JD, Smith SJ (2000) Filopodia, spines, and the generation of synaptic diversity. *Neuron* 27:11-14.
- Kabir N, Schaefer AW, Nakhost A, Sossin WS, Forscher P (2001) Protein kinase C activation promotes microtubule advance in neuronal growth cones by increasing average microtubule growth lifetimes. *J Cell Biol* 152:1033-1044.

- Kaech S, Fischer M, Doll T, Matus A (1997) Isoform specificity in the relationship of actin to dendritic spines. *J Neurosci* 17:9565-9572.
- Kater SB, Mills LR (1991) Regulation of growth cone behavior by calcium. *J Neurosci* 11:891-899.
- Kater SB, Mattson MP, Cohan C, Connor J (1988) Calcium regulation of the neuronal growth cone. *Trends Neurosci* 11:315-321.
- Keller JN, Steiner MR, Mattson MP, Steiner SM (1996) Lysophosphatidic acid decreases glutamate and glucose uptake by astrocytes. *J Neurochem* 67:2300-2305.
- Kidd T, Russell C, Goodman CS, Tear G (1998a) Dosage-sensitive and complementary functions of roundabout and commissureless control axon crossing of the CNS midline. *Neuron* 20:25-33.
- Kidd T, Brose K, Mitchell KJ, Fetter RD, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Tear G (1998b) Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell* 92:205-215.
- Kirov SA, Harris KM (1999) Dendrites are more spiny on mature hippocampal neurons when synapses are inactivated. *Nat Neurosci* 2:878-883.
- Kobayashi H, Koppel AM, Luo Y, Raper JA (1997) A role for collapsin-1 in olfactory and cranial sensory axon guidance. *J Neurosci* 17:8339-8352.
- Kolodkin AL, Levengood DV, Rowe EG, Tai YT, Giger RJ, Ginty DD (1997) Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* 90:753-762.
- Konur S, Ghosh A (2005) Calcium signaling and the control of dendritic development. *Neuron* 46:401-405.
- Kranenburg O, Poland M, van Horck FP, Drechsel D, Hall A, Moolenaar WH (1999) Activation of RhoA by lysophosphatidic acid and G $\alpha$ <sub>12/13</sub> subunits in neuronal cells: induction of neurite retraction. *Mol Biol Cell* 10:1851-1857.
- Kuruville R, Ye H, Ginty DD (2000) Spatially and functionally distinct roles of the PI3-K effector pathway during NGF signaling in sympathetic neurons. *Neuron* 27:499-512.
- Lanier LM, Gates MA, Witke W, Menzies AS, Wehman AM, Macklis JD, Kwiatkowski D, Soriano P, Gertler FB (1999) Mena is required for neurulation and commissure formation. *Neuron* 22:313-325.
- Li Z, Sheng M (2003) Some assembly required: the development of neuronal synapses. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:833-841.
- Lin CH, Espreafico EM, Mooseker MS, Forscher P (1996) Myosin drives retrograde F-actin flow in neuronal growth cones. *Neuron* 16:769-782.
- Lippman J, Dunaevsky A (2005) Dendritic spine morphogenesis and plasticity. *J Neurobiol* 64:47-57.
- Lipscombe D, Madison DV, Poenie M, Reuter H, Tsien RW, Tsien RY (1988) Imaging of cytosolic Ca<sup>2+</sup> transients arising from Ca<sup>2+</sup> stores and Ca<sup>2+</sup> channels in sympathetic neurons. *Neuron* 1:355-365.
- Lipton SA, Kater SB (1989) Neurotransmitter regulation of neuronal outgrowth, plasticity and survival. *Trends Neurosci* 12:265-270.
- Luo L (2002) Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18:601-635.
- Markus A, Zhong J, Snider WD (2002) Raf and akt mediate distinct aspects of sensory axon growth. *Neuron* 35:65-76.
- Mattson MP, Taylor-Hunter A, Kater SB (1988) Neurite outgrowth in individual neurons of a neuronal population is differentially regulated by calcium and cyclic AMP. *J Neurosci* 8:1704-1711.
- McCormick F (1995) Ras-related proteins in signal transduction and growth control. *Mol Reprod Dev* 42:500-506.
- McDermott MI, Sigal YJ, Sciorra VA, Morris AJ (2004) Is PRG-1 a new lipid phosphatase? *Nat Neurosci* 7:789; author reply 789-790.
- McKinney RA, Capogna M, Durr R, Gähwiler BH, Thompson SM (1999) Miniature synaptic events maintain dendritic spines via AMPA receptor activation. *Nat Neurosci* 2:44-49.

- Meberg PJ, Ono S, Minamide LS, Takahashi M, Bamburg JR (1998) Actin depolymerizing factor and cofilin phosphorylation dynamics: response to signals that regulate neurite extension. *Cell Motil Cytoskeleton* 39:172-190.
- Ming GL, Song HJ, Berninger B, Holt CE, Tessier-Lavigne M, Poo MM (1997) cAMP-dependent growth cone guidance by netrin-1. *Neuron* 19:1225-1235.
- Ming GL, Wong ST, Henley J, Yuan XB, Song HJ, Spitzer NC, Poo MM (2002) Adaptation in the chemotactic guidance of nerve growth cones. *Nature* 417:411-418.
- Mitchison T, Kirschner M (1988) Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* 1:761-772.
- Mitchison TJ, Cramer LP (1996) Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 84:371-379.
- Moolenaar WH (1999) Bioactive lysophospholipids and their G protein-coupled receptors. *Exp Cell Res* 253:230-238.
- Moolenaar WH, van Meeteren LA, Giepmans BN (2004) The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *Bioessays* 26:870-881.
- Morise H, Shimomura O, Johnson FH, Winant J (1974) Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry* 13:2656-2662.
- Morris R (1992) Thy-1, the enigmatic extrovert on the neuronal surface. *Bioessays* 14:715-722.
- Mueller BK (1999) Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Annu Rev Neurosci* 22:351-388.
- Nakamura F, Kalb RG, Strittmatter SM (2000) Molecular basis of semaphorin-mediated axon guidance. *J Neurobiol* 44:219-229.
- Nakayama AY, Harms MB, Luo L (2000) Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* 20:5329-5338.
- Narumiya S, Ishizaki T, Watanabe N (1997) Rho effectors and reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett* 410:68-72.
- Nguyen Ba-Charvet KT, Brose K, Marillat V, Kidd T, Goodman CS, Tessier-Lavigne M, Sotelo C, Chedotal A (1999) Slit2-Mediated chemorepulsion and collapse of developing forebrain axons. *Neuron* 22:463-473.
- Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y (1997) 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 407:313-319.
- Passafaro M, Nakagawa T, Sala C, Sheng M (2003) Induction of dendritic spines by an extracellular domain of AMPA receptor subunit GluR2. *Nature* 424:677-681.
- Patel BN, Van Vactor DL (2002) Axon guidance: the cytoplasmic tail. *Curr Opin Cell Biol* 14:221-229.
- Penzes P, Beeser A, Chernoff J, Schiller MR, Eipper BA, Mains RE, Huganir RL (2003) Rapid induction of dendritic spine morphogenesis by trans-synaptic ephrinB-EphB receptor activation of the Rho-GEF kalirin. *Neuron* 37:263-274.
- Pokorny J, Yamamoto T (1981) Postnatal ontogenesis of hippocampal CA1 area in rats. II. Development of ultrastructure in stratum lacunosum and moleculare. *Brain Res Bull* 7:121-130.
- Portera-Cailliau C, Weimer RM, De Paola V, Caroni P, Svoboda K (2005) Diverse modes of axon elaboration in the developing neocortex. *PLoS Biol* 3:e272.
- Rose CR, Konnerth A (2001) Stores not just for storage. intracellular calcium release and synaptic plasticity. *Neuron* 31:519-522.
- Round J, Stein E (2007) Netrin signaling leading to directed growth cone steering. *Curr Opin Neurobiol* 17:15-21.
- Ryan SK, Shotts LR, Hong SK, Nehra D, Groat CR, Armstrong JR, McClellan AD (2007) Glutamate regulates neurite outgrowth of cultured descending brain neurons from larval lamprey. *Dev Neurobiol* 67:173-188.
- Saneyoshi T, Wayman G, Fortin D, Davare M, Hoshi N, Nozaki N, Natsume T, Soderling TR (2008) Activity-dependent synaptogenesis: regulation by a CaM-kinase kinase/CaM-kinase I/betaPIX signaling complex. *Neuron* 57:94-107.

- Sanna PP, Cammalleri M, Berton F, Simpson C, Lutjens R, Bloom FE, Francesconi W (2002) Phosphatidylinositol 3-kinase is required for the expression but not for the induction or the maintenance of long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *J Neurosci* 22:3359-3365.
- Santos Da Silva J, Schubert V, Dotti CG (2004) RhoA, Rac1, and cdc42 intracellular distribution shift during hippocampal neuron development. *Mol Cell Neurosci* 27:1-7.
- Savaskan NE, Brauer AU, Nitsch R (2004) Molecular cloning and expression regulation of PRG-3, a new member of the plasticity-related gene family. *Eur J Neurosci* 19:212-220.
- Scannevin RH, Huganir RL (2000) Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses. *Nat Rev Neurosci* 1:133-141.
- Schmitt JM, Wayman GA, Nozaki N, Soderling TR (2004) Calcium activation of ERK mediated by calmodulin kinase I. *J Biol Chem* 279:24064-24072.
- Schwartzkroin PA, Kunkel DD (1982) Electrophysiology and morphology of the developing hippocampus of fetal rabbits. *J Neurosci* 2:448-462.
- Scott EK, Luo L (2001) How do dendrites take their shape? *Nat Neurosci* 4:359-365.
- Scott EK, Reuter JE, Luo L (2003) Small GTPase Cdc42 is required for multiple aspects of dendritic morphogenesis. *J Neurosci* 23:3118-3123.
- Segal I, Korkotian I, Murphy DD (2000) Dendritic spine formation and pruning: common cellular mechanisms? *Trends Neurosci* 23:53-57.
- Sholl DA (1953) Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat* 87:387-406.
- Sigal YJ, McDermott MI, Morris AJ (2005) Integral membrane lipid phosphatases/phosphotransferases: common structure and diverse functions. *Biochem J* 387:281-293.
- Sigal YJ, Quintero OA, Cheney RE, Morris AJ (2007) Cdc42 and ARP2/3-independent regulation of filopodia by an integral membrane lipid-phosphatase-related protein. *J Cell Sci* 120:340-352.
- Skutella T, Nitsch R (2001) New molecules for hippocampal development. *Trends Neurosci* 24:107-113.
- Spacek J, Harris KM (1997) Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. *J Neurosci* 17:190-203.
- Sretavan DW, Shatz CJ, Stryker MP (1988) Modification of retinal ganglion cell axon morphology by prenatal infusion of tetrodotoxin. *Nature* 336:468-471.
- Stein E, Tessier-Lavigne M (2001) Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science* 291:1928-1938.
- Stein E, Savaskan NE, Ninnemann O, Nitsch R, Zhou R, Skutella T (1999) A role for the Eph ligand ephrin-A3 in entorhino-hippocampal axon targeting. *J Neurosci* 19:8885-8893.
- Steup A, Ninnemann O, Savaskan NE, Nitsch R, Puschel AW, Skutella T (1999) Semaphorin D acts as a repulsive factor for entorhinal and hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 11:729-734.
- Steup A, Lohrum M, Hamscho N, Savaskan NE, Ninnemann O, Nitsch R, Fujisawa H, Puschel AW, Skutella T (2000) Sema3C and netrin-1 differentially affect axon growth in the hippocampal formation. *Mol Cell Neurosci* 15:141-155.
- Steward O, Falk PM (1991) Selective localization 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* 314:545-557.
- Stoppini L, Buchs PA, Muller D (1991) A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37:173-182.
- Stukey J, Carman GM (1997) Identification of a novel phosphatase sequence motif. *Protein Sci* 6:469-472.
- Svoboda K, Mainen ZF (1999) Synaptic [Ca<sup>2+</sup>]: intracellular stores spill their guts. *Neuron* 22:427-430.

- Takemoto-Kimura S, Ageta-Ishihara N, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Mano T, Okamura M, Fujii H, Fuse T, Hoshino M, Suzuki S, Kojima M, Mishina M, Okuno H, Bito H (2007) Regulation of dendritogenesis via a lipid-raft-associated Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase CLICK-III/CaMKI $\gamma$ . *Neuron* 54:755-770.
- Tanaka E, Sabry J (1995) Making the connection: cytoskeletal rearrangements during growth cone guidance. *Cell* 83:171-176.
- Tang F, Dent EW, Kalil K (2003) Spontaneous calcium transients in developing cortical neurons regulate axon outgrowth. *J Neurosci* 23:927-936.
- Tapon N, Hall A (1997) Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 9:86-92.
- Tashiro A, Minden A, Yuste R (2000) Regulation of dendritic spine morphology by the rho family of small GTPases: antagonistic roles of Rac and Rho. *Cereb Cortex* 10:927-938.
- Trimbuch T et al. (2009) Synaptic PRG-1 modulates excitatory transmission via lipid phosphate-mediated signaling. *Cell* 138:1222-1235.
- Uboha NV, Flajolet M, Nairn AC, Picciotto MR (2007) A calcium- and calmodulin-dependent kinase I $\alpha$ /microtubule affinity regulating kinase 2 signaling cascade mediates calcium-dependent neurite outgrowth. *J Neurosci* 27:4413-4423.
- Uesaka N, Hirai S, Maruyama T, Ruthazer ES, Yamamoto N (2005) Activity dependence of cortical axon branch formation: a morphological and electrophysiological study using organotypic slice cultures. *J Neurosci* 25:1-9.
- Van Aelst L, D'Souza-Schorey C (1997) Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 11:2295-2322.
- von Bohlen Und Halbach O (2009) Structure and function of dendritic spines within the hippocampus. *Ann Anat* 191:518-531.
- Wayman GA, Impey S, Marks D, Saneyoshi T, Grant WF, Derkach V, Soderling TR (2006) Activity-dependent dendritic arborization mediated by CaM-kinase I activation and enhanced CREB-dependent transcription of Wnt-2. *Neuron* 50:897-909.
- Wayman GA, Kaech S, Grant WF, Davare M, Impey S, Tokumitsu H, Nozaki N, Banker G, Soderling TR (2004) Regulation of axonal extension and growth cone motility by calmodulin-dependent protein kinase I. *J Neurosci* 24:3786-3794.
- Wiederkehr A, Staple J, Caroni P (1997) The motility-associated proteins GAP-43, MARCKS, and CAP-23 share unique targeting and surface activity-inducing properties. *Exp Cell Res* 236:103-116.
- Wong RO, Ghosh A (2002) Activity-dependent regulation of dendritic growth and patterning. *Nat Rev Neurosci* 3:803-812.
- Wu GY, Deisseroth K, Tsien RW (2001) Spaced stimuli stabilize MAPK pathway activation and its effects on dendritic morphology. *Nat Neurosci* 4:151-158.
- Yamada RX, Sasaki T, Ichikawa J, Koyama R, Matsuki N, Ikegaya Y (2008) Long-range axonal calcium sweep induces axon retraction. *J Neurosci* 28:4613-4618.
- Yoshihara Y, De Roo M, Muller D (2009) Dendritic spine formation and stabilization. *Curr Opin Neurobiol* 19:146-153.
- Zakharenko S, Popov S (1998) Dynamics of axonal microtubules regulate the topology of new membrane insertion into the growing neurites. *J Cell Biol* 143:1077-1086.
- Zha XM, Green SH, Dailey ME (2005) Regulation of hippocampal synapse remodeling by epileptiform activity. *Mol Cell Neurosci* 29:494-506.
- Zhang H, Webb DJ, Asmussen H, Horwitz AF (2003) Synapse formation is regulated by the signaling adaptor GIT1. *J Cell Biol* 161:131-142.
- Zhang QX, Pilquill CS, Dewald J, Berthiaume LG, Brindley DN (2000) Identification of structurally important domains of lipid phosphate phosphatase-1: implications for its sites of action. *Biochem J* 345 Pt 2:181-184.
- Zheng JQ, Wan JJ, Poo MM (1996) Essential role of filopodia in chemotropic turning of nerve growth cone induced by a glutamate gradient. *J Neurosci* 16:1140-1149.
- Ziv NE, Smith SJ (1996) Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron* 17:91-102.

## Danksagung

Professor Dr. Robert Nitsch danke ich für das Überlassen dieses interessanten und vielseitigen Forschungsthemas und für die Möglichkeit, diese Arbeit im Institut für Zell- und Neurobiologie in Berlin anfertigen und auch beenden zu können.

Bei Professor Dr. Constance Scharff möchte ich mich herzlich für die Bereitschaft zur Übernahme des Erstgutachtens bedanken.

Des Weiteren danke ich den Mitgliedern der Prüfungskommission für ihr Entgegenkommen.

Ich danke Dr. Johannes Vogt, der als Supervisor meine Arbeit begleitet hat.

Ich danke Dr. Thorsten Trimbuch dafür, dass er die KO Maus erschaffen hat und Jan Baumgart für die *in utero* Elektroporationen. Ich danke Dr. Ulf Strauß und Arne der AG Strauß für die Durchführung der elektrophysiologischen Messungen auf der Zielstrecke der Arbeit.

Für die Hilfe bei der Etablierung der Zwei-Photonenanlage möchte ich mich bei Jutta Schüler (auch für die Hilfe bei allen anderen Mikroskopen) und Jörg Rösner bedanken. Danke auch an Dr. Carl Roth, der den Computer so manches Mal unter die Lupe nehmen musste.

Ein ganz großer Dank an die TAs Denis Lajkó, Katja Rösler und Nadine Orrin (ehem. Burghardt).

Bei Juniorprof. Dr. Anja Bräuer möchte ich mich dafür bedanken, dass Sie mir nach dem Umzug nach Mainz in Ihrem Doktorandenzimmer und Labor Unterschlupf gewährt hat. Ohne die ruhige Ecke würde ich wahrscheinlich heute noch schreiben.

Für ihre mentale Unterstützung und dafür, dass sie einfach da waren (in so mancher Gruppensitzung), bedanke ich mich bei Juniorprof. Dr. Anja Bräuer, Beate Geist, Brita Vorwerk, Katja Rösler und Dr. Nicola Brandt.

Für das Korrekturlesen der Arbeit bedanke ich mich ganz herzlich bei Dr. Olga Kieselmann, Dr. Olaf Ninnemann und Dr. Daniel Hechler.

Bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Zell- und Neurobiologie möchte ich mich für die nette und manchmal aufschlussreiche Arbeitsatmosphäre bedanken. Dabei möchte ich mich insbesondere bedanken bei (in alphabetischer Reihenfolge): André, Anne, Arne, Beate, Brita, Daniel, David, Denis, Doreen, Greta, Ines, Jan, Karen, Katja, Lorenza, Nadine, Suman, Thorsten, Olga.

Der größte Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester Karin für den Rückhalt, den Sie mir gegeben haben, für die unermüdliche und bedingungslose Unterstützung während der ganzen langen Zeit meiner Arbeit. Ich danke Ihnen für das Vertrauen in mich, das so manches Mal größer war als mein eigenes.

Ich danke meinen Freunden und meinem Freund Sven, die sich immer schön brav alles angehört haben und auch nach Fertigstellung meiner Doktorarbeit noch mit mir reden 😊.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Leslie Schlüter, an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, den \_\_\_\_\_ 2010

Leslie Schlüter

## Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

# Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.