

Untersuchung zur physiologischen Rolle von PRG-1 anhand der Generierung
und Phänotypisierung von PRG-1 defizienten Mausmodellen

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

Thorsten Trimbuch
aus Frankfurt (Oder)

März, 2009

1. Gutachter: Prof. Dr. Robert Nitsch

2. Gutachter: Prof. Dr. Dietmar Schmitz

Disputation am 08.05.2009

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	VI
Zusammenfassung	VII
Abstract	IX
A Einleitung	1
A.1 Das „Plasticity Related Gene – 1“ (PRG-1)	1
A.1.1 Die Entdeckung von PRG-1	1
A.1.2 Struktur und Eingruppierung von PRGs	1
A.2 Lipid Phosphat Phosphatasen und LPA vermittelte Signaltransduktion	2
A.2.1 Die PAP Familie	3
A.2.1.1 Die PAP1 Klasse	3
A.2.1.2 Die PAP2 Klasse (LPP)	3
A.2.2 Expression und Struktur der LPPs	4
A.2.3 Funktionen der LPPs und die LPA Signaltransduktion	5
A.2.3.1 Signaltransduktion durch LPA	5
A.2.3.2 Einfluss auf Signaltransduktionsvorgänge durch Synthese und Abbau	7
A.2.3.3 Physiologische Rolle der LPPs	9
A.3 PRG-1 moduliert LPA Signaltransduktionsvorgänge	12
A.4 Ziel der Arbeit	14
B Material und Methoden	15
B.1 Material	15
B.1.1 Allgemeine Chemikalien und Reagenzien	15
B.1.2 Verwendete Enzyme	15
B.1.3 Bakterienstämme	16
B.1.4 Bakterien Wachstumsmedien und –platten	16
B.1.5 Antibiotika	17
B.1.6 Plasmide / BAC	17
B.1.7 Oligonukleotide	18
B.1.7.1 Primer zur Herstellung des Targeting Vektors pPRG-1-KO	18
B.1.7.2 Primer zur Amplifikation der Southern Blot Sonden für PRG-1-KO	18

B.1.7.3	Primer zur Amplifikation der internen Northern Blot Sonde P1 für PRG-1-KO	18
B.1.7.4	Primer zum Screening der PRG-1-KO ES-Zellen	18
B.1.7.5	Primer zur Genotypisierung der PRG-1-KO Mäuse	18
B.1.7.6	Primer zur Herstellung des Targeting Vektors für pPRG1cKO	18
B.1.7.7	Primer zur Amplifikation der Southern Blot Sonden für PRG-1 cKO	19
B.1.7.8	Primer zur Genotypisierung der PRG1cKO Maus	19
B.1.7.9	Primer zur Amplifikation des murinen PRG-1 Gens und Klonierung in pCAG	19
B.1.7.10	Primer zur Amplifikation der DIG-RNA Sonden aus dem PRG-1 Gen	19
B.1.7.11	Primer zur Einführung von Punktmutationen in das murine PRG-1 Gen	19
B.1.8	Antikörper	20
B.1.9	Puffer und Lösungen	21
B.1.9.1	Agarose Gel Elektrophorese	21
B.1.9.2	Plasmid Extraktion	21
B.1.9.3	Isolierung genomischer DNA	21
B.1.9.4	Northern Blot und Southern Blot Puffer	21
B.1.9.5	Proteinisolierung und Western Blot Puffer	21
B.1.9.6	Immunhistochemische Puffer und Lösungen	22
B.1.9.7	Puffer für die Herstellung primärer neuronaler Zellkulturen	23
B.2	Methoden	24
B.2.1	Fließschema	24
B.2.2	Allgemeine molekularbiologische Methoden	25
B.2.2.1	Auftrennung von DNA mittels Agarose Gel Elektrophorese	25
B.2.2.2	Aufreinigen von DNA Fragmenten	25
B.2.2.3	Phenol/Chloroform Extraktion	26
B.2.2.4	Ethanol-Natriumacetat-Fällung	26
B.2.2.5	Bestimmung der Konzentration von DNA und RNA	26
B.2.2.6	Herstellung transformationskompetenter Zellen	27
B.2.2.6.1	Hitzekompetente Zellen	27
B.2.2.6.2	Elektrokompetente Zellen	27
B.2.2.7	Transformation von <i>E.coli</i> Zellen	28
B.2.2.7.1	Hitzetransformation	28
B.2.2.7.2	Elektrotransformation	28
B.2.2.8	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	29
B.2.2.8.1	TOPO TA Klonierung von PCR Produkten	29
B.2.2.8.2	Einführen von Punktmutationen	30
B.2.2.9	Restriktionsverdau von DNA	30
B.2.3	Isolierung von Nukleinsäuren	31
B.2.3.1	Minipräparation von Plasmid DNA	31
B.2.3.2	Minipräparation von BAC DNA	31
B.2.3.3	Maxipräparation von Plasmid DNA	31

B.2.3.4	Maxipräparation endotoxin-freier Plasmid DNA	32
B.2.3.5	Isolierung von mRNA und Herstellung von cDNA	32
B.2.3.6	Isolierung von genomischer DNA	33
B.2.3.6.1	Genomische DNA für PCR	33
B.2.3.6.2	Genomische DNA für Southern Blots	34
B.2.4	Klonierung von DNA Fragmenten	35
B.2.4.1	Bereitstellung der Ausgangs DNA Fragmente	35
B.2.4.2	Auffüllen der überhängenden Enden zu glatten Enden	35
B.2.4.3	Dephosphorylierung von DNA Fragmenten	35
B.2.4.4	Ligation von DNA Fragmenten	35
B.2.5	Rekombination von DNA Fragmenten in Bakterienzellen	36
B.2.5.1	Homologe Rekombination über Red-Gene	36
B.2.5.2	Sequenzspezifische Rekombination über Cre und FLP Rekombinasen	37
B.2.6	Embryonale Stammzellkultur und Blastocysteninjektion	37
B.2.7	Nachweis der Rekombination per Southern Blot Analyse	38
B.2.7.1	Restriktionsverdau, Agarosegellauf und Southern Blot	38
B.2.7.2	Herstellung radioaktiv markierter DNA Sonden	39
B.2.7.3	Radioaktive Hybridisierung und Autoradiographie	39
B.2.8	Nachweis von mRNA per Northern Blot	40
B.2.8.1	Probenvorbereitung	40
B.2.8.2	Gellauf, Transfer, Hybridisierung und Autoradiographie	40
B.2.9	Analyse der Proteinexpression per Western Blot	40
B.2.9.1	Isolierung von Membranproteinen aus Mausgewebe	41
B.2.9.2	Isolierung von Synaptosomen	41
B.2.9.3	Quantifizierung von Proteinkonzentrationen	41
B.2.9.4	Elektrophoretische Auftrennung (SDS-PAGE)	42
B.2.9.5	Transfer der Proteine (Western Blot)	42
B.2.9.6	Immundetektion der transferierten Proteine	42
B.2.10	Zellkulturarbeiten	43
B.2.10.1	Präparation von primären Neuronen	43
B.2.10.2	Phospholipid Aufnahmeexperimente an primären Neuronen	44
B.2.11	Histologische Methoden	44
B.2.11.1	Perfusion von Mäusen	44
B.2.11.2	Herstellung von Gewebeschnitten	45
B.2.11.2.1	Kryostatschnitte	45
B.2.11.2.2	Vibratomschnitte	45
B.2.11.3	X-Gal Färbung	45
B.2.11.4	TIMM Färbung	46
B.2.11.5	Immunhistochemische Färbungen	46
B.2.11.5.1	In situ Hybridisierung von Gefriergewebeschnitten	46
B.2.11.5.2	DAB Färbung	48

B.2.11.5.3	Fluoreszenz Färbung	49
B.2.11.6	Mikroskopische Auswertung	49
B.2.12	Tierexperimentelles Arbeiten	49
B.2.12.1	Induzierung von Anfällen durch Kainatinjektionen	49
B.2.12.2	<i>In utero</i> Elektroporation	50
B.2.13	Elektrophysiologische Messungen	50
B.2.14	Statistische Auswertungen	50
C	Ergebnisse	51
C.1	Generierung PRG-1 defizienter Mäuse	51
C.1.1	Knockout Strategien	51
C.1.2	Vektorkonstruktion des konstitutiven Knockouts	52
C.1.2.1	PCR der homologen DNA Fragmente	52
C.1.2.2	Klonierung des Zielvektors pPRG1-KO	53
C.1.3	Vektorkonstruktion des konditionellen Knockouts	54
C.1.3.1	PCR der homologen Bereiche der Rekombinationsvektoren	54
C.1.3.2	Klonierung der Rekombinationsvektoren	55
C.1.3.3	Rekombinationen zum Zielvektor pPRG1-cKO	55
C.1.4	Screening embryonaler Stamm (ES)-Zellen	57
C.1.4.1	Stammzellen für den Konstitutiven Knockout	57
C.1.4.2	Stammzellen für den konditionellen Knockout	59
C.1.5	Generierung chimärer Mäuse und Keimbahntransmission	61
C.1.5.1	Konstitutiver Knockout PRG-1-KO	61
C.1.5.2	Konditioneller Knockout PRG-1-cKO	62
C.1.6	Verifizierung der Knockout Mäuse	62
C.1.6.1	Konstitutiver Knockout PRG-1-KO	62
C.1.6.2	Konditioneller Knockout PRG-1-cKO	64
C.2	Phänotypisierung der PRG-1 Knockout Maus	65
C.2.1	<i>LacZ</i> Reporter als Marker der PRG-1 Expression	65
C.2.2	Beobachtungen zur PRG-1-KO Maus Linie	68
C.2.2.1	PRG-1-KO Mäusen besitzen erhöhte juvenile Sterberate	68
C.2.2.2	PRG-1-KO Mäuse weisen Entwicklungsdefizite auf	68
C.2.2.3	PRG-1-KO Mäuse zeigen spontane Anfälle	69
C.2.2.4	Adulte PRG-1-KO Mäuse besitzen eine erhöhte Anfälligkeit nach Kainat-Injektionen	72
C.2.3	Morphologischen Veränderungen in PRG-1-KO Mäusen	73
C.2.4	CA1 Pyramidenzellen von PRG-1-KO Mäusen sind übererregbar	74
C.2.5	Keine offensichtlichen Unterschiede in der Expression der Marker der synaptischen Maschinerie.	76
C.2.6	Komplementierung des Phänotyps und Einzelzell-KO durch <i>in utero</i> Elektroporation	78

C.2.7	Untersuchungen zur modulatorischen Funktion von PRG-1 auf die LPA Signaltransduktion mittels der PRG-1-KO Maus	80
C.2.7.1	Geringere Lipid Aufnahme in primären Neuronen von PRG-1-KO Mäusen	80
C.2.7.2	<i>In utero</i> Elektroporation eines mutierten PRG-1 Proteins zeigt keine Normalisierung der mEPSC Frequenz	81
C.2.7.3	PRG-1/LPA ₂ - KOs zeigen keine höhere Erregbarkeit	82
D	Diskussion	84
D.1	Generierung der PRG-1 defizienten Mäuse	84
D.2	PRG-1 ist ein neuronales Molekül, lokalisiert in glutamatergen Synapsen	85
D.3	PRG-1 Defizienz führt zu einer erhöhten Mortalität aufgrund einer Imbalance zwischen erregenden und inhibitorischen Signalen	87
D.4	Höhere Erregbarkeit ist eine direkte Folge der PRG-1 Defizienz und durch eine fehlende retrograde Aktion von PRG-1 begründet	88
D.5	PRG-1 moduliert die synaptische Transmission durch seinen Einfluss auf die präsynaptische LPA Signaltransduktion	92
D.6	Fazit und Ausblick	95
E	Literaturverzeichnis	97
F	Anhang	105
F.1	Erklärung	105
F.2	Publikationen und Posterpräsentationen	105
F.2.1	Publikationen	105
F.2.2	Konferenzbeiträge durch Posterpräsentationen	106
F.3	Lebenslauf	107
F.4	Danksagung	109

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
ATX	Autotaxin
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovine serum albumin
CA1-3	Cornu ammonis Area 1-3
cDNA	Complementary DNA
DAG	Diacylglycerol
DG	Gyrus dentatus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP(s)	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat(e)
E	Tag der embryonalen Entwicklung
EEG	Elektroenzephalogramm / -grafie
EPSC	exzitatorischer postsynaptischer Strom
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
HC	Hippocampus
IUE	<i>in utero</i> Elektroporation
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
LPA	Lysophosphatsäure
LPP	Lipid Phosphat Phosphatasen
MAG	Monoacylglycerol
MB	Maßstabsbalken
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
NGS	Normales Ziegenserum
P	Tag der postnatalen Entwicklung
PA	Phosphatidat
PAP	Phosphatidat Phosphatasen
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PRG	Plasticity Related Gene
PSC	postsynaptischer Strom
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SE	Status epilepticus
SSC	Saline Sodium Citrat
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TM	Transmembrandomänen
U	Unit / Enzymeinheit
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- beta-D-galactopyranoside
ZNS	Zentrales Nervensystem

Zusammenfassung

Die Informationsübertragung an Synapsen ist essentiell für neuronale Prozesse im Nervensystem. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das gehirnspezifische, neuronale Protein Plasticity-Related-Gene-1 (PRG-1) die exzitatorische Informationsübertragung an Synapsen moduliert.

PRG-1 ist ein integrales Membranprotein und zeigt deutliche Homologien zu Lipid Phosphat Phosphatasen (LPP). So besitzt PRG-1 die charakteristischen LPP Merkmale von drei konservierten Domänen, welche es den LPPs erlauben, „bioaktive“ Lipidphosphate wie Phosphatidat (PA), Lysophosphatidat (LPA) oder Sphingosin-1-Phosphat (S1P) enzymatisch zu dephosphorylieren. Solche Lipidphosphate sind Schlüsselfaktoren in Rezeptor vermittelten Signalkaskaden (z.B. über LPA-Rezeptoren) und sind daher an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt. Deshalb wird angenommen, dass LPPs mittels dieses Phosphatase Motivs als negative Regulatoren solcher rezeptorvermittelten Signaltransduktionen fungieren. Im Gegensatz zu den LPPs besitzt jedoch PRG-1 ein unvollständiges Phosphatase Motiv, so dass es nicht diesen Mechanismus der Dephosphorylierung durchführen kann. Trotzdem konnte in früheren Arbeiten in einer neuronalen Zelllinie, die mit einem PRG-1-GFP Fusionskonstrukt transfiziert wurde und LPA ausgesetzt wurde, eine erhöhte Konzentration an LPA Degradationsprodukten sowie Schutz vor LPA-induzierter Neuritenretraktion beobachtet werden.

Um die physiologische Rolle von PRG-1 und dessen Einfluss auf Lipidphosphat-vermittelte Signaltransduktion genauer zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit eine konstitutive und eine konditionelle Knockout (KO) Maus für PRG-1 generiert. Unter Verwendung einer eingefügten Reporter-kassette innerhalb des konstitutiven KO Deletionskonstruktes konnte im Hippocampus eine spezifische Expression von PRG-1 in glutamatergen, Neuronen gezeigt werden. Bei heterozygoten Verpaarungen wurde schließlich beobachtet, dass ca. 50 % der PRG-1 defizienten Nachkommen an den Folgen konvulsiver Anfälle innerhalb der ersten 3 bis 4 Wochen starben. Durch eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dietmar Schmitz konnten diese juvenilen Anfälle durch *in-vivo* EEG Aufnahmen dargestellt werden. Weiterhin zeigten Kainat Applikationen an adulten heterozygoten und homozygoten PRG-1-KO Tieren eine erhöhte Anfallsbereitschaft dieser Tiere. Elektrophysiologische Messungen in Kooperation mit der AG Schmitz zeigten eine spezifische erhöhte Erregbarkeit der exzitatorisch glutamatergen, hippocampalen CA1 Neurone. Trotz dieser Veränderungen waren die zelluläre Morphologie in Bezug auf die Entwicklung der Neurone bzw. Interneurone, die Expression der wichtigsten synaptischen Marker und die elektrophysiologischen intrinsischer Eigenschaften der Zellen unverändert.

Durch die Klonierung von Expressionsvektoren für PRG-1 bzw. Cre-Rekombinase konnte mittels *in utero* Elektroporationstechniken PRG-1 spezifisch in einzelnen hippocampalen CA1 Neuronen von PRG-1 defizienten Tiere exprimiert bzw. in den generierten, konditionellen PRG-1-cKO Mäusen deletiert werden. Die elektrophysiologische Analyse der elektroporierten und nicht-elektroporierten Zellen zeigte, dass rein postsynaptisches PRG-1 die Präsynapse retrograd beeinflussen muss.

Um diesen Einfluss von PRG-1 im Hinblick auf die LPA Signaltransduktionsvorgänge zu untersuchen, wurden Aufnahmeexperimente mit fluoreszenzmarkierten PA Analoga an primären Neuronen von Wildtyp und PRG-1-KO Mäusen durchgeführt. Es zeigte sich, dass KO Neurone eine geringere Fähigkeit besitzen, diese Lipidphosphate intrazellulär zu akkumulieren, so dass angenommen wird, dass PRG-1 die extrazelluläre Konzentration an Lipidphosphaten im synaptischen Spalt regulieren könnte. Schließlich zeigte 1. die *in utero* Elektroporation (IUE) eines PRG-1 Konstruktes, welches an einer essentiellen Aminosäure innerhalb des Phosphatase Motivs mutiert wurde, und 2. die Verpaarung mit einer LPA₂ Rezeptor KO Maus, dass die physiologische Funktion von PRG-1 durch dessen Einfluss auf eine Lipidphosphat vermittelte Signaltransduktion an der Synapse definiert sein müsste.

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass der LPA₂ Rezeptor präsynaptisch, und PRG-1 postsynaptisch spezifisch auf exzitatorischen Synapsen glutamaterger Neurone lokalisiert wurde, beschreibt diese Arbeit einen neuen möglichen Regulationsmechanismus der exzitatorischen Signalübertragung, der über PRG-1 vermittelt wird.

Abstract

Synaptic transmission is the essential feature of neuronal information processing in the nervous system. This thesis reveals that the brain-specific, neuronal protein Plasticity-Related-Gene-1 (PRG-1) modulates synaptic transmission specifically at excitatory synapses.

PRG-1 is an integral membrane protein and shows homologies to lipid phosphate phosphatases (LPP). PRG-1 contains the characteristic LPP features of three conserved extracellular domains which enables the LPPs to dephosphorylate bioactive lipid phosphates like phosphatidate (PA), lysophosphatidate (LPA) or sphingosine-1-phosphate (S1P). These bioactive lipid phosphates are key factors in initiating receptor-directed signalling cascades (e.g. via LPA receptors) and are therefore involved in diverse cellular processes. Therefore it has been proposed that LPPs may act as negative regulators of these signalling. In contrast to the LPPs PRG-1 lacks critical amino acids within the conserved domains which imply that PRG-1 is not able to dephosphorylate LPA using the same mechanism which has been proposed for the LPPs. However, in earlier studies it has been shown, that the neuronal cell line N1E-115, transfected with a PRG-1-GFP fusion construct and exposed to LPA, exhibits increased extracellular LPA dephosphorylation products and thereby protection against LPA induced neurite collapse.

In order to elucidate the physiological role of PRG-1 and its influence in lipid phosphate mediated signal transduction a constitutive and a conditional PRG-1 knockout (KO) mouse were generated. Thereby a specific expression of PRG-1 has been shown in glutamatergic neurons of the hippocampus by using an introduced reporter construct within the constitutive deletion construct. Furthermore it was observed that during heterozygous breeding approximately 50 % of PRG-1 deficient litters died due to the consequences of spontaneous seizures within the first three postnatal weeks. By cooperation with the group of Prof. Dietmar Schmitz these juvenile seizures could be monitored by *in-vivo* EEG recordings. Furthermore kainat applications demonstrated in adult heterozygous and homozygous PRG-1-KO animals a reduced threshold to develop seizures. Electrophysiological measurement in cooperation with the group of Prof. Dietmar Schmitz revealed a specific increase of excitability of hippocampal glutamatergic CA1 neurons. Despite these results, the cellular morphology regarding the development of neurons and interneurons, the expression of important synaptic markers and the electrophysiological intrinsic properties of the cells were unchanged.

By generating expression vectors for PRG-1 and Cre-recombinase and utilizing *in-utero*

electroporation techniques PRG-1 could be expressed specifically in single CA1 neurons of PRG-1 deficient animals respectively could be deleted in the generated conditional PRG-1-cKO mice. The electrophysiological analysis of electroporated and non-electroporated cells revealed that postsynaptic PRG-1 influences the presynapse.

To further elucidate the impact of PRG-1 regarding LPA signal transduction uptake experiments with fluorescent labelled PA analogs has been performed on WT and PRG-1-KO primary neurons. Thereby it was revealed that KO neurons possess a reduced capability to accumulate lipid phosphates within the cell which led to the hypothesis that PRG-1 can regulate the extracellular concentration of lipid phosphate within the synaptic cleft. Finally, by *in-utero* electroporation of a PRG-1 expression construct which has been mutated at an essential amino acid within the conserved domain and by breeding of the PRG-1-KO mice with the LPA₂ receptor KO mice it has been shown, that the physiological function of PRG-1 may be defined by its influence in lipid phosphate mediated signal transduction at the synapse.

Under consideration of the fact that the LPA₂ receptor is localised presynaptically and PRG-1 is localised postsynaptically at excitatory synapses of glutamatergic neurons this thesis describes a new possible mechanism of regulating excitatory transmission mediated by PRG-1.

A EINLEITUNG

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

A.1.1 Die Entdeckung von PRG-1

Die molekularen Mechanismen der Ausbildung und der Stabilisierung entorhinal-hippocampalen Verbindungen sowie der Reorganisation nach Läsion dieses Systems im Gehirn sind bisher weitgehend unbekannt. In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Nitsch (Charité) wurde auf der Grundlage eines entorhinal-hippocampalen Läsionsmodells, der entorhinalen Kortexläsion (ECL), und molekularbiologischen Techniken (DDRT-PCR, SSH) nach Genen gesucht, die während des axonalen Wachstums und des regenerativen Sproutings eine dynamische Expression aufweisen. So wurde durch Bräuer et al. 2003 ein Gen entdeckt, das nach einer ECL spezifisch im Hippocampus und entorhinalen Kortex in seiner Expression hochreguliert wurde und während der Entwicklung eine gehirnspezifische Expression und Regulation aufweist [1]. Die Expression beginnt mit Embryonaltag 19 (E19) in der hippocampalen Anlage. Nach der Geburt wurde eine Hochregulation des Transkripts in den Körner- und Pyramidenzellen des Gyrus Dentatus und der Cornu Ammonis des Hippocampus und entorhinalen Kortex mittels der *in situ* Hybridisierung beobachtet [1]. Es wurde angenommen, dass dieses Gen eine wichtige Rolle bei den plastischen Umbauprozessen nach einer Schädigung und während der Entwicklung im Gehirn spielt. Es wurde daraufhin „Plasticity Related Gene -1“ (PRG-1) genannt (NCBI Zugriffsschlüssel: AF541279) [1].

A.1.2 Struktur und Eingruppierung von PRGs

Hydrophobizitätsanalysen des 766 Aminosäuren (AS) großen PRG-1 Proteins haben ergeben, dass es am Amino (N)-Terminus 6 Transmembrandomänen (TM) und am Carboxy (C)-Terminus einen ca. 400 AS langen hydrophilen Bereich besitzt [1] (Abbildung 1 A). Vergleiche der PRG-1 Proteinsequenz mit bekannten Strukturen anderer Proteine durch Protein BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) Untersuchungen zeigt, dass PRG-1 innerhalb des N-terminus spezifische Domänen besitzt, die es in die Gruppe der PAP2 (Phosphatidic Acid Phosphatase) Superfamilie eingruppiert (siehe Abbildung 1 B; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Durch *in silico* Sequenzanalysen konnten bis jetzt 4 weitere Proteine (PRG-2 - 5) gefunden werden, die hohe Homologien zu PRG-1 aufweisen [2]. Von diesen besitzt jedoch nur PRG-2 einen ebenfalls langen hydrophilen C-Terminus [1, 2]. Weiterhin konnten Sequenzvergleiche zeigen, dass die PRG-Familie deutliche Homologien zu bekannten membrangebundenen Lipid Phosphat Phosphatasen (LPP)

besitzt, so dass sie auch LPRs (lipid phosphatase related proteins) genannt werden [1, 3, 4]. Sie bilden eine Untergruppe in der Lipid Phosphatase / Phosphotransferase Familie [4] (siehe Abbildung 1 C). Nach dem strukturellen Modell der Orientierung der LPPs in der Plasmamembran [5, 6] wird angenommen, dass der C-terminale, hydrophile Bereich von PRG-1 ähnlich wie bei LPPs auf der zytoplasmatischen Seite und spezifische charakteristische Domänen, die bei den LPPs verantwortlich für deren PAP2 Aktivität sind [7], auf der extrazellulären Seite liegen müssen [1] (Abbildung 1 D).

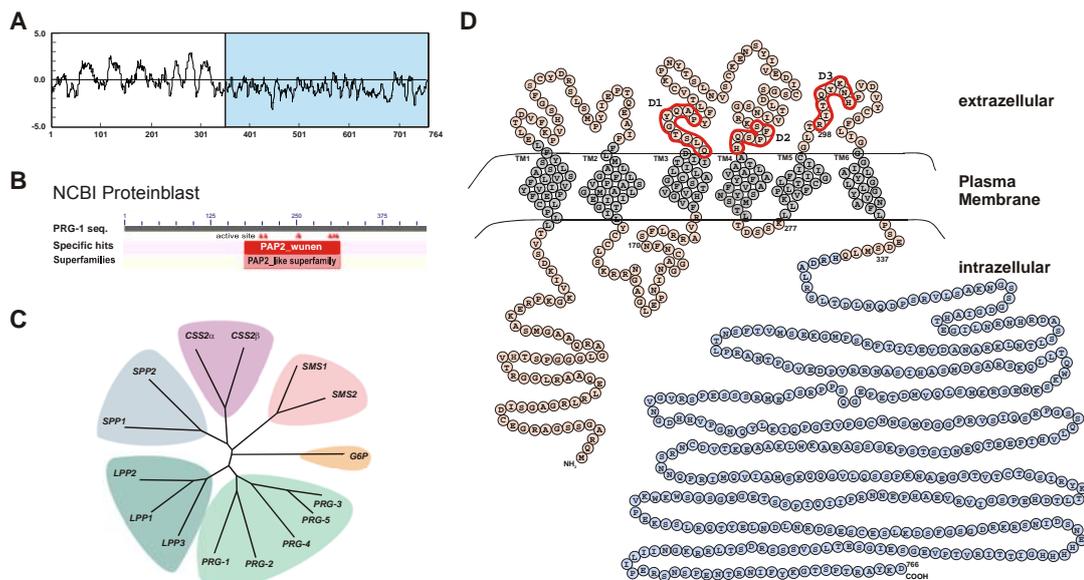


Abbildung 1. Struktur von PRG-1 und Eingruppierung der PRG Familie. (A) Hydrophobizitätsanalysen zeigen 6 TM und einen hydrophilen 400 AS C-terminalen Bereich (aus [1]). (B) NCBI (National Center for Biotechnology Information) Proteinblast zeigt das Vorhandensein spezifischer Domänen innerhalb der N-Terminale 350 AS, die das PRG-1 Protein zur PAP2 Superfamilie eingruppiert. (C) Protein Sequenzvergleiche zeigen deutliche Homologien der PRGs mit LPPs. Sie bilden eine neue Klasse der Lipid Phosphatase / Phosphotransferase Familie (hier ein phylogenetischer Baum aus [4]). (D) Strukturmodell von PRG-1. Basierend auf dem LPP Modellstruktur liegt der hydrophile C-terminus (Blau) intrazellulär, wohingegen spezifische Domänen, die bei den LPPs zur Interaktion mit Lipid Phosphaten führen, extrazellulär sind (rot umrandet: D1-D3).

A.2 Lipid Phosphat Phosphatasen und LPA vermittelte Signaltransduktion

Aufgrund der Eingruppierung der PRG Familie als verwandte Moleküle der Lipid Phosphat Phosphatasen (LPP) [2-4] werden in den folgenden Abschnitten die PAP Klassen, die Expression und die Struktur der LPPs, die LPA vermittelte Signaltransduktion und die mögliche physiologische Funktion der LPPs näher erläutert, um später im Kapitel A.3 auf den möglichen Einfluss von PRG-1 auf diese Signaltransduktion eingehen zu können.

A.2.1 Die PAP Familie

Phosphatidat Phosphatasen (PAP von Phosphatidat Phosphohydrolase, EC 3.1.3.4) katalysieren die Dephosphorylierung von Phosphatidat (PA, Diacylglycerin-3-phosphat) zu Diacylglycerol (DAG) [8] und spielen daher eine wichtige Rolle bei der Synthese von Glycerolipiden und in der Phospholipid-vermittelten Signaltransduktion. Die PAP Familie unterteilt sich in zwei Gruppen: die Mg^{2+} anhängige, N-ethylmaleimid (NEM) sensitive PAP1 Klasse und in die Mg^{2+} unabhängige, NEM insensitive PAP2 Klasse [6, 9].

A.2.1.1 Die PAP1 Klasse

PAP1 ist im Zytosol lokalisiert und wird durch Translokation in das endoplasmatische Retikulum aktiviert, wo das Enzym an der Glycerolipidsynthese durch die Produktion von DAG aus PA beteiligt ist [6, 10, 11]. Vermutlich aufgrund der Instabilität des Proteins, der damals verwendeten Bestimmungsmethode zur PAP Aktivität [12] und der Existenz von mehreren Isoformen, war es lange nicht möglich, das PAP1 Enzym aus Säugerzellen zu isolieren, so dass sich die Arbeiten zur Aufklärung der PAP1 Struktur, der Aktivität, der Interaktion mit anderen Proteinen oder der intrazellulären Lokalisation als schwierig gestalteten [6, 13]. Erst kürzlich konnte das erste PAP1 Molekül in *S. cerevisiae* funktionell durch Han et al. (2006) charakterisiert werden (*PAH1* Gen) [14]. Es zeigte sich, dass das von *PAH1* kodiert PAP1 Protein (Pah1p) in C- und N-terminalen Regionen hohe Sequenzhomologien zu dem bereits bekannten Protein Lipin 1 besitzt [14, 15]. Da Lipin 1 defiziente Mäuse eine verminderte Entwicklung von adipösem Gewebe aufweisen, welches zu Lipodystrophie führt, wurde 2001 Lipin 1 als Protein identifiziert, das den Fettmetabolismus in Säugerzellen reguliert [15, 16]. Die biochemische Charakterisierung von rekombinantem Lipin 1 ergab nun, dass es über PAP1 Aktivität verfügt und damit das gesuchte Säugetier-PAP1 darstellt [14]. Aufgrund der bekannten PAP1 Funktion, als vorletztes Enzym zur Synthese von Triacylglycerol (TAG, aus DAG und PA), dem Hauptenergiespeicher in adipösem Gewebe, beteiligt zu sein, konnte der dahinterliegende molekulare Mechanismus, der zur Lipodystrophie führt, mit der Entdeckung des homologen Pah1p PAP1 Proteins erklärt werden [13, 17, 18].

A.2.1.2 Die PAP2 Klasse (LPP)

Für die Typ2 Aktivität der PAP Enzyme konnte zunächst nachgewiesen werden, dass sie sich im Unterschied zu der PAP1 Klasse in Membranpräparationen anreichern ließ [19]. Aufreinigungen von PAP2 Enzymen zeigten, dass sie eine breite Substratspezifität besitzen. Neben PA können eine Vielzahl von „bioaktiven“ Lipid Phosphaten, wie Lysophosphatidat (LPA), Sphingosin-1-Phosphat (S1P), Ceramid-1-Phosphat (C1P) und DAG Pyrophosphat (DGPP), durch Enzyme der PAP2 Klasse *in vitro* dephosphoryliert werden, so dass daher

angenommen wurde, dass PAP2 Enzyme die Signaltransduktion dieser Lipid Phosphate *in vivo* beeinflussen könnten [6, 20].

Aufgrund der hohen Substratspezifität von PAP1 zu PA kann es korrekterweise als PA Phosphatase (PAP) bezeichnet werden. Das breite Substratspektrum der Klasse der PAP2 Enzyme hingegen veranlasste 1998 Brindley und Waggoner zur Umbenennung dieser Enzymklasse in Lipid Phosphat Phosphatasen (LPP) [21].

A.2.2 Expression und Struktur der LPPs

1996 beschrieb Kai et al. als erster Maus PAP2A (LPP-1) [22]. Daraufhin konnten schnell weitere LPPs kloniert werden (LPP-2, LPP-3) [23-25] (für Genbank Zugriffsschlüssel und weitere Referenzen siehe Review [6]). LPP-1 und LPP-3 zeigen ein ubiquitäres Expressionsmuster. Die mRNA Transkripte beider LPPs sind stark exprimiert im Gehirn und peripheren Nervensystem, in der Aorta, Uterus, Niere, Brustdrüse, Prostata und Gefäßsystem (NCBI, UniGene Expressionsprofil per „expressed sequence tags“ (EST), siehe Review [4]). Hingegen ist das mRNA Transkript von LPP-2 weniger stark exprimiert und stärker auf einzelne Gewebe begrenzt. LPP-2 mRNA ließ sich nur in geringem Maße im Gehirn feststellen, jedoch in höheren Konzentrationen im Darm, Pankreas und Gebärmutter (NCBI, UniGene Expressionsprofil, siehe Review [4]).

Die ca. 32 kDa großen LPPs besitzen 6 stark hydrophobe AS Sequenzbereiche und somit 6 mutmaßliche TM Domänen [22]. Mittels der Überexpression getaggtter Varianten der LPPs und in einigen Fällen auch mittels spezifischer LPP Antikörper wurde die subzelluläre Lokalisation der LPPs in einer Reihe verschiedener Zelllinien untersucht. Die so exprimierten Proteine sind vorwiegend im endoplasmatischen Retikulum und in der Plasmamembran lokalisiert [5, 26-29].

Stukey und Carman erkannten 1997, dass die neu entdeckten LPPs zu einer neuen Superfamilie von Phosphatasen mit einem neuartigen konservierten Phosphatase Sequenz Motiv gehören [30]. Diese Superfamilie wurde anschließend durch Hemrika et al. [31], Neuwald [32] und Brindley und Waggoner [21] erweitert, so dass zu ihr bakterielle Phosphatasen und Diacylglycerolpyrophosphatasen (DGPPase) [33, 34]; Hefe DGPPase [35], Phytosphingosin Phosphat Phosphatasen [36, 37] und LPP [38]; Pilz Haloperoxidasen [39]; Säugertier Glucose-6-Phosphatase [40, 41] und das Drosophila LPP Ortholog Wunen [42] gehören. Alle Enzyme dieser Superfamilie besitzen ein Motiv, welches sich in 3 Domänen (D) aufteilt (D1: KXXXXXXRP, D2: SXH, D3: RXXXXXHXXXD) (siehe Abbildung 4) [30]. Durch Mutationsanalysen der konservierten AS Reste in Maus LPP1 konnte gezeigt werden, dass die durch LPP1 gezeigte PAP2 Aktivität und damit das aktive Zentrum durch dieses Motiv definiert wird [7].

Aufgrund der intrazellulären Lokalisation des C-terminalen Endes von LPP1 [5] wird angenommen, dass die 3 konservierten Domänen und dadurch das aktive Zentrum auf der extrazellulären Seite der Zellmembran lokalisiert sind [7] (Vergleich mit PRG-1 siehe Abbildung 1 D). Diese Annahme wird weiterhin durch die Entdeckung der außerhalb liegenden N-Glykosilierungsstelle im hydrophilen Bereich zwischen Domain 1 und 2 gestützt [7]. Aufgrund des außerhalb der Zelle liegenden aktiven Zentrums stellen LPPs Ektoenzyme dar, die in die durch extrazelluläre Lipid Phosphate hervorgerufene Signaltransduktion eingreifen könnten [7].

A.2.3 Funktionen der LPPs und die LPA Signaltransduktion

A.2.3.1 Signaltransduktion durch LPA

Lysophosphatsäure (LPA, lysophosphatic acid, 1-Acyl-Glycerol-3-Phosphat) ist eines der einfachsten Lipid Phosphate, das nicht nur natürlicher Bestandteil von Zellmembranen ist, sondern auch ein interzelluläres Signalmolekül darstellt. Bereits 1957 wurde der pharmakologische Effekt von LPA als aktiver Bestandteil von „Darmstoff“ auf die Kontraktion der glatten Muskulatur beschrieben [43-45]. Später (1979) wurde LPA auch als Faktor für die Aggregation von Blutzellen bekannt [46, 47]. Jedoch erst 1989 bekam die „LPA-Forschung“ mehr Aufschwung, als entdeckt wurde, dass LPA die Proliferation von Fibroblasten wahrscheinlich über einen noch unbekanntem G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR) induziert, da der LPA Effekt durch Pertussis Toxin (PTX) geblockt werden konnte [48]. Die bis dahin nicht erwartete Existenz eines spezifischen LPA-Rezeptors konnte erstmals 1992 durch Bindungsstudien mit markierten Liganden gezeigt werden [49]. Während der Suche nach heptahelicalen Rezeptorproteinen, die innerhalb des embryonalen cerebralen Kortex in ihrer Expression hochreguliert wurden, konnte Hecht et al. 1996 schließlich den ersten LPA Rezeptor klonieren (LPA₁) [50]. Das humane LPA₁ Gen kodiert für ein 41 kDa Protein, welches aus 364 AS mit 7 TM Domänen besteht [50]. Sequenzähnlichkeiten und degenerierte PCR Strategien erlaubten anschließend die Identifizierung von zwei weiteren GPCRs (LPA₂, LPA₃) [51-54]. Erst kürzlich konnte die Identifizierung von weiteren GPCRs mit hoher Affinität zu LPA beschrieben werden, die jedoch mit einer AS Identität von 20-24 % zu LPA₁₋₃ nur noch entfernt mit den ursprünglich entdeckten Rezeptoren verwandt sind (LPA₄, LPA₅) [55-57].

Die LPA Rezeptoren werden nahezu in allen Säugetiergeweben mit einem zeitlich regulierenden Expressionsmuster exprimiert (Review: [58]). Der Hauptort der Rezeptorexpression ist jedoch das Nervensystem. Das Expressionsprofil unterliegt dort neuronalen Entwicklungsprozessen, wie Neurogenese, neuronaler Migration, Neuritogenese und Myelinisierungen (Review: [59]).

Inzwischen ist mehrfach gezeigt worden, dass die LPA spezifischen Rezeptoren die Vielzahl der beobachteten LPA-Antworten, wie erhöhte Zellproliferation [48], Zellmigration [60], Kontraktion [45], Blutzellaggregation [46], Wundheilung [61, 62], Schutz vor Apoptose [63], Neuritenretraktion [64-66] und der Einfluss auf kortikale Entwicklungsprozesse [67, 68], über multiple Typen von gekoppelten heterotrimeren G-Proteinen (G_i , G_q , $G_{12/13}$, G_s) und ihrer aktivierenden intrazellulären Second Messenger Moleküle vermitteln (Review: [69-71]). So interagieren LPA_1 und LPA_2 mit G_i , G_q und $G_{12/13}$ [72, 73], LPA_3 mit G_i und G_q [73], LPA_4 mit G_s [53] und LPA_5 mit G_q und $G_{12/13}$ [57]. Jedes dieser G-Proteine bewirkt unterschiedliche zelluläre Antworten auf einen über den spezifischen LPA Rezeptor vermittelten extrazellulären LPA Stimulus (siehe Abbildung 2).

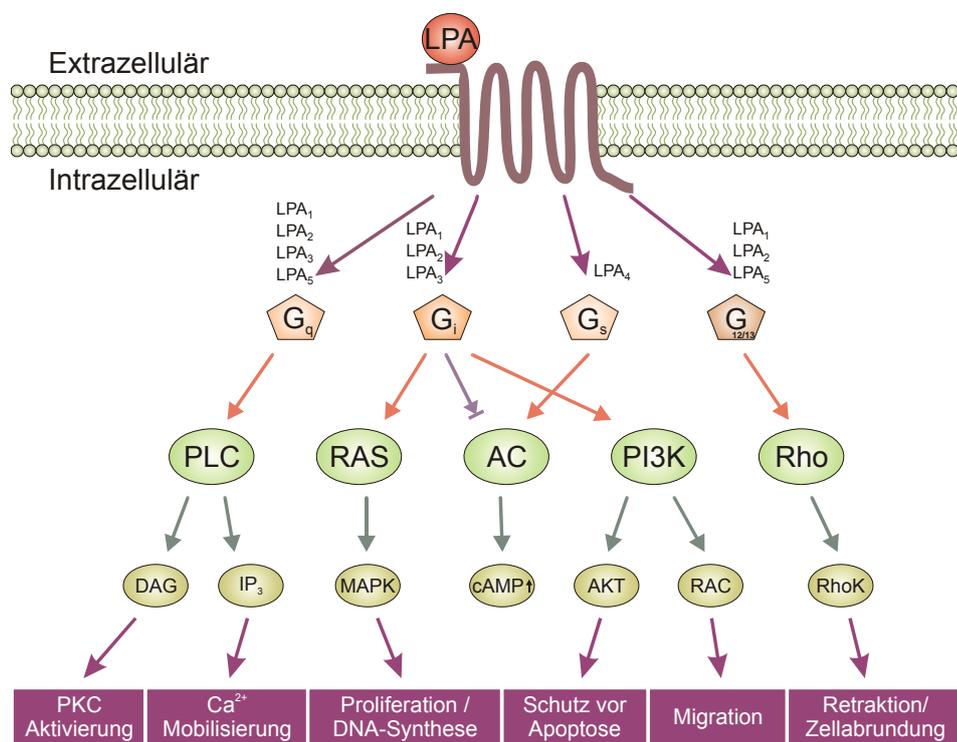


Abbildung 2. Hauptwege der Signaltransduktion durch LPA. Die LPA Rezeptoren LPA_{1-5} aktivieren als G-Protein gekoppelte Rezeptoren verschiedene Subklassen von heterotrimeren G-Proteinen (G_q , G_i , G_s , $G_{12/13}$) und damit eine Reihe von intrazellulären Signalkaskaden, die zu einer Vielzahl von LPA Antworten führen. (modifiziert nach [74], Abkürzungen siehe Text)

So bewirkt die G_q Aktivierung die Stimulation der Phospholipase C (PLC), die durch Hydrolyse von Phosphatidylinositolbisphosphat DAG und Inositoltriphosphate (IP_3) als Second Messenger Moleküle generiert. Dies führt zur Ca^{2+} Mobilisierung und zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) [48] (Review: [59, 74]).

Die Aktivierung von G_i führt zur Stimulation von drei bekannten Signalwegen: 1. Inhibierung der Adenylyl Cyclase (AC); 2. Stimulation der RAS-MAPK (mitogen-aktivierte Protein

Kinase) Kaskade und damit Förderung der DNA-Synthese und Zellproliferation; und 3. die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), welches zur Aktivierung der RAC GTPase [75] und des Antiapoptose Signalwegs über AKT (=PKB/Proteinkinase B) [63] führt und somit Einfluss auf die Regulation des Cytoskeletts, Zellmorphologie und Migration bzw. auf das Überleben der Zellen ausübt. (Review: [59, 74, 76]).

Die Aktivierung des $G_{12/13}$ G-Proteins bewirkt die Aktivierung von RhoA, welches wiederum die Rho-Kinase aktiviert, die kontraktile Ereignisse wie Neuritenretraktion oder Zellabrundungen steuert [77].

Die Aktivierung des G_s G-Proteins durch den LPA_4 Rezeptor führt im Gegensatz zur G_i induzierten Inhibition zur Aktivierung der AC, welches eine cAMP Akkumulation und damit Induktion der Ca^{2+} Mobilisation bewirkt [55]. Diese gegensätzlichen Signalwege (G_s/G_i) verdeutlichen, dass die durch LPA vermittelten Signaltransduktionen von Zelltyp zu Zelltyp, je nach der Zusammensetzung und der Expressionsniveaus der Rezeptoren und der Signalmoleküle, variieren können.

A.2.3.2 Einfluss auf Signaltransduktionsvorgänge durch Synthese und Abbau

Eines der wichtigsten Themen, die im Zusammenhang mit der LPA Signaltransduktion stehen, ist die Frage, wie und wo bioaktives extrazelluläres LPA produziert und wie seine Konzentration kontrolliert werden kann.

Nachdem 1979 Schumacher et al. die blutzellaggregierende Eigenschaft von LPA im Serum entdeckt hatte [46], konnte 1986 Tokumura et al. in Rattenplasma zeigen, dass dieses extrazelluläre LPA enzymatisch durch eine Lysophospholipase D (lysoPLD) aus Lysophosphatidylcholin (LPC) gebildet wird [78]. Jedoch erst 2002 konnte Tokumura et al. Plasma lysoPLD isolieren und charakterisieren [79]. So konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym identisch mit dem Protein Autotaxin (ATX) ist, einer seit bereits 1992 bekannten ecto-Nukleotid Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 2 (NPP2) [79, 80]. ATX/NPP2 kommt in zahlreichen Geweben vor mit höchsten mRNA Konzentrationen im Gehirn, Ovarien, Lunge, Darm und Niere [81]. Obwohl gezeigt werden konnte, dass ATX/NPP2 *in vitro* auch Nukleotide hydrolysieren kann, ist in den letzten Jahren jedoch deutlich geworden, dass ATX/NPP2 physiologisch primär als lysoPLD funktioniert und daher extrazelluläres LPA aus komplexeren lyso-Phospholipiden, wie zum Beispiel LPC, generieren kann (Review [82]). Durch die Generierung der ATX/NPP2 Knockout (KO) Maus wurde die physiologische Bedeutung von ATX/NPP2 für die LPA Synthese noch deutlicher. So sind homozygote KO Mäuse mit Beginn der ATX Expression um E10 embryonal lethal und heterozygote KO Mäuse weisen im Vergleich zu Wildtyp (WT) Mäuse die Hälfte der Plasma LPA Konzentrationen auf [83, 84]. Das sekretierte vorliegende ATX/NPP2 wird somit als primäre

Quelle der extrazellulären LPA Produktion angenommen [82], jedoch konnte auch gezeigt werden, dass ein zweiter Weg der extrazellulären LPA Produktion existiert, der durch die Phospholipase A₂ (PLA₂) bei Entzündungen gesteuert wird. Unter diesen Bedingungen gibt es Zellen, die ihre Membran Phospholipid-Asymmetrie verlieren und PA auf ihren äußeren Membranen exponieren, so dass die bei Entzündungen hochregulierte sekretierte PLA₂ extrazelluläres LPA von diesem PA generieren kann [85]. Es gibt jedoch keine Hinweise darauf, dass unter normalen physiologischen Bedingungen Zellen intrazelluläres PA zu LPA durch zytosolische Phospholipasen A₂ oder A₁ generieren und ähnlich wie bei der Sekretion von anderen Mediatoren und Hormonen anschließend in die extrazelluläre Umgebung abgegeben könnten (Review [82]).

Das generierte extrazelluläre LPA kann in verschiedenen biologischen Flüssigkeiten, wie zum Beispiel Serum [86], Plasma [78, 87], Speichel [88], Samen- und Follikelflüssigkeit [87, 89] und im Liquor [90] nachgewiesen werden. Es wird angenommen, dass neben dem synthetisierenden Enzym ATX/NPP2 die LPPs, durch die Dephosphorylierung von LPA zu dem nicht bioaktiven Monoacylglycerol (MAG) über ihr Ekto-Phosphatase Motiv, die LPA Konzentration in einem streng kontrollierten Gleichgewicht halten (siehe Abbildung 3) (Review: [3, 82]).

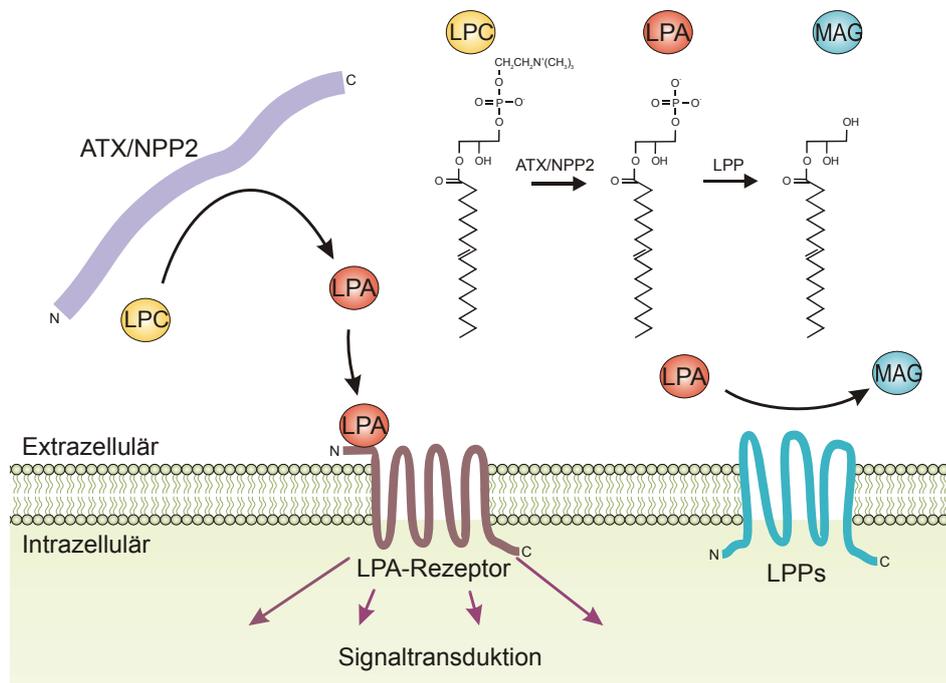


Abbildung 3. Möglicher Regulationsmechanismus der LPA induzierten Signaltransduktion. LPA (Lysophosphatsäure) wird durch die Lysophospholipase D ATX/NPP2 aus LPC (Lysophosphatitylcholin) synthetisiert, kann über G-Protein gekoppelte LPA Rezeptoren Signaltransduktionsvorgänge auslösen und wird durch Lipid-Phosphat-Phosphatasen (LPPs) zu MAG (Monoacylglycerol) dephosphoryliert (modifiziert von [74]).

Eine Überexpression von mLPP-1 bewirkt in Fibroblasten eine verminderte, durch exogenes LPA stimulierte, MAPK Aktivierung und DNA Synthese aufgrund der Dephosphorylierung des LPAs zu MAG [5]. Weiterhin zeigte die Überexpression von hLPP-3 in Eierstockkrebszellen eine vermindertes Wachstum und Tumorentwicklung der Zellen aufgrund erhöhter Degradation von exogenem LPA [91]. Smyth et al. vermutet 2003, dass LPP-1 als zentrales Regulatorprotein in der LPA Signaltransduktion des kardiovaskulären Systems fungiert [92]. So konnte gezeigt werden, dass intakte Blutplättchen und Membranen der Plättchen aktiv exogenes LPA durch die Expression von LPP-1 degradieren können [92]. Interessanterweise war außerdem die Plasmamembranlokalisation von LPP-1 nach der Exposition der Zellen mit exogenem LPA erhöht [92]. Aufgrund der beobachteten Ergebnisse wird angenommen, dass LPPs durch die Reduzierung der extrazellulären LPA Konzentration als negative Regulatoren der Rezeptor gesteuerten LPA-Signaltransduktion fungieren könnten (Review: [3, 4]).

Aufgrund der Existenz von LPP auf internen Membranen der Zelle wird weiterhin angenommen, dass LPPs auch auf den Fettstoffwechsel und damit auch auf die Signaltransduktion innerhalb einer Zelle durch die Kontrolle der Balance zwischen PA und DAG regulierend eingreifen könnten (Review: [3, 4]). So konnte 1998 gezeigt werden, dass nach der Überexpression von LPP-1 die PA Konzentrationen durch die Konvertierung zu DAG aufgrund der PAP Aktivität in Zellen verringert wird [93]. Die Überexpression von LPP-3 führte in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) zu einer Konzentrationserhöhung an DAG nachdem die Phospholipase D (PLD) stimuliert wurde, die aus Phosphatidylcholine (PC) PA generiert [27]. Das gebildete DAG könnte somit anschließende Signaltransduktionsvorgänge beeinflussen (Review: [3]).

A.2.3.3 Physiologische Rolle der LPPs

Trotz der oben beschriebenen Ergebnisse ist die tatsächliche physiologische Bedeutung der LPPs noch relativ ungeklärt, da der größte Teil der experimentellen LPP Studien auf Überexpression in Zellkultursystemen basiert. Die Generierung von Tiermodellen erlaubte es, die physiologische Rolle der LPPs *in vivo* genauer zu studieren. Leider führte die Deletion von LPP-2 in Mäusen zu keinen genaueren Erkenntnissen, die die *in vivo* Funktion von LPP-2 erklären könnten. LPP-2 defiziente Mäuse sind lebensfähig und besitzen keinerlei offensichtlichen Phänotyp, was nahelegt, dass dessen physiologische Funktion von anderen örtlich und zeitlich gleich exprimierten LPPs ersetzt werden kann [94] (Review [4]). KO Mäuse für LPP-1 wurden bisher nicht beschrieben. Mäuse, die LPP-1 überexprimieren, zeigen verschiedene phänotypische Veränderungen, wie reduziertes Körpergewicht, eine verminderte Anzahl an Haarfollikeln und eine eingeschränkte Spermatogenese [95]. Erstaunlicherweise wurden keine signifikanten Unterschiede in den basalen Konzentrationen

von 5 verschiedenen Acyl-Spezies von LPA in dem Blut von LPP-1 überexprimierenden Mäusen festgestellt [95]. Weiterhin gab es im Vergleich zu früheren Experimenten an LPP-1 überexprimierenden Fibroblasten [5] auch keine signifikanten Unterschiede in der Aktivierung des RAS/MAPK Signalweges nach Stimulation von Fibroblasten von LPP-1 transgenen Mäusen mit Phospholipiden, wie LPA [95]. Dieses anscheinende Fehlen der Korrelation zwischen LPP-1 Überexpression und LPA Degradation macht deutlich, dass LPP-1 auch eine andere physiologische Rolle *in vivo* besitzen könnte, die nicht vordergründig mit dessen katalytischen PAP2 Aktivität erklärt werden kann.

So wird eine weitere von der Phosphataseaktivität unabhängige physiologische Rolle durch Escalante-Alcalde et al. 2003 auch in LPP-3 defizienten Mäusen gezeigt. Der KO von LPP-3 unterscheidet sich zum KO von LPP-2 dahingehend, dass er schwerwiegende phänotypische Veränderungen bewirkt. Neben der, durch die fehlende PAP2 Aktivität, intrazellulär erhöhten Konzentrationen von PA, verringerten DAG und erhöhten extrazellulären Konzentrationen von LPA in embryonalen LPP-3 KO Fibroblasten, bewirkte die homozygote Inaktivierung des *lpp-3* Gens in Mäusen auch frühe embryonale Lethalität durch Defekte in der Bildung der Blutgefäße und in 30 % der untersuchten homozygoten Embryos auch durch Defekte der Ausbildung der anterior / posterior Achsensymmetrie [96]. Dieser letztere Phänotyp wird auch bei der Inaktivierung von Axin, einem negativen Regulator des Wnt Signalweges, beobachtet [97]. Im normalen Zustand bindet und degradiert Axin aktiviertes cytosolisches β -Catenin und reguliert durch Verringerung der nukleären Translokation eines β -Catenin/TCF-komplexes anschließende spezifische Genexpressionen [97]. Interessanterweise führte die Ausschaltung von *lpp-3* zu einer Aktivierung des Wnt Signalweges [96]. So war die Expression eines Wnt Reporter Gen Konstruktes in LPP-3 KO Zellen höher als in WT Zellen [96]. Zugleich konnte die ektopische Expression von LPP3 in LPP-3 KO Zellen die Wnt Aktivität auf WT Niveau reduzieren [96]. Hingegen konnte die Expression einer mutierten LPP-3 Form, die PAP inaktiv ist, nicht wie angenommen die Wnt Aktivität erhöhen, sondern reduziert die Aktivität wie bei der katalytisch aktiven LPP-3 Form [96]. So wird angenommen, dass eine mögliche physiologische Rolle von LPP-3 die eines negativen Regulators des Wnt Signalweges ist und es dies ohne die Einbeziehung der Ektophosphatasefunktion ausführen kann [96]. Der dahinterliegende Mechanismus konnte jedoch noch nicht detailliert aufgeklärt werden.

Eine weitere physiologische Rolle der LPPs kommt aus Studien in *Drosophila*. Zwei LPP homologe Proteine, Produkte der *wunen* Gene, Wun und Wun2 spielen eine entscheidende Rolle bei der Steuerung der Keimzellmigration und des Keimzellüberlebens während der Embryogenese in *Drosophila* [42, 98-100]. Zhang et al. konnte 1997 durch P-Element Mutagenese zeigen, dass die Expression von Wun repulsiv auf die aus dem Endoderm in das Mesoderm einwandernden Keimzellen wirkt und innerhalb des Endoderms die

Ausgangsposition dieser Zellen definiert [42]. In *wun* defizienten Embryos zerstreuen sich die Keimzellen über den gesamten Embryo, schaffen es nicht das Mesoderm zu erreichen und sterben schließlich [42]. Wird *Wun* jedoch in Geweben ektopisch überexprimiert, die normalerweise Keimzellen anziehen, wirkt *Wun* repulsiv, die Keimzellen wandern nicht in das Gewebe ein und sterben [42]. 2001 konnte Starz-Gaiano et al. *wun2* identifizieren und zeigte, dass sich das Gen in einem Abstand von nur 5 kb zu dem bereits entdeckten *wunen* Gen befindet, und dass beide Gene in der ursprüngliche *wunen* Mutationen beeinflusst waren [99]. Die Zerstörung eines der 2 Gene hatte jeweils keinen Effekt auf die Keimzellmigration, was daraufhin deutet, dass beide Gene redundant agieren [99]. Aufgrund ihrer Homologien zu LPPs wurde angenommen, dass der repulsive Effekt auf die Keimzellmigration ein Ergebnis ihrer Fähigkeit ist, einen Lipid-Faktor zu degradieren, der auf die Keimzellen als Leitmolekül und Überlebensfaktor wirkt (Review [4]). Verstärkt wurde diese Annahme durch Mutationen innerhalb des konservierten Phosphatase Motivs. Es zeigte sich, dass die PAP Aktivität notwendig war, um auf Keimzellen repulsierend wirken zu können [99].

Zusätzlich zeigte 2004 Renault et al. das *Wun2* neben der Expression auf somatischen, keimzell-repulsiven Geweben auch spezifisch auf den Keimzellen exprimiert wird [100]. So konnte eine neue divergente Funktion von *Wun2* beschrieben werden. Wenn *Wun2* auf Keimzellen exprimiert wird, fördert es ihr Überleben. Hingegen führt die Expression von *Wun2* auf somatischen Zellen zu einer Repulsion der Keimzellen und zum Tod [100]. Dies führte zu der Annahme, dass somatisches *Wun* und *Wun2* mit dem Keimzell-*Wun2* um ein Phospholipid als Substrat konkurrieren. Aufgrund der Tatsache, dass es bislang nicht gelungen ist, G-Protein gekoppelte LPA Rezeptoren in *Drosophila* zu identifizieren, wurde durch Renault et al. eine neue Möglichkeit der Signaltransduktion durch Lipid Phosphate in *Drosophila* diskutiert [100]. So konnte gezeigt werden, dass in Insektenzellen überexprimiertes *Wun2* fluoreszierende Lipid Dephosphorylierungsprodukte von PA Analoga akkumuliert [100], die wiederum intrazelluläre Signalkaskaden auslösen könnten (z.B. durch DAG). So könnte es durchaus möglich sein, dass die Aufnahme von dephosphorylierten Lipiden durch *Wun* oder *Wun2* die primäre Signalfunktion in *Drosophila* darstellt [100] (Review [4]).

Die beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass der physiologische Einfluss der LPPs auf Signaltransduktionsvorgänge mannigfaltig ist und nicht in jedem Falle auf die Phospholipid Phosphatase Aktivität zurückzuführen ist. Die genauen molekularen Mechanismen sind jedoch nur ansatzweise verstanden, oftmals hypothetisch und bedürfen noch weiterer Forschungen.

A.3 PRG-1 moduliert LPA Signaltransduktionsvorgänge

Bräuer et al. konnten 2003 zeigen, dass das PRG-1 Protein entwicklungsabhängig und spezifisch von neuronalen Zellen im Gehirn exprimiert wird [1]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass nach einer Schädigung des Gehirns die PRG-1 Expression hochreguliert wird (siehe A.1.1) [1]. Außerdem zeigten immunologische, ultrastrukturelle Untersuchungen, dass sich das PRG-1 Protein nach einer Schädigung auf neu auswachsenden Axonen befindet [1]. Aufgrund der hohen Homologien zu den oben beschriebenen LPPs wurde angenommen, dass PRG-1 eine neue Phospholipid Phosphatase darstellt, die während des axonalen Wachstums und des regenerierenden axonalen Auswachsens eine regulatorische Rolle auf die durch LPA induzierte Neuritenretraktionen besitzen könnte [1]. So konnten Bräuer et al. zeigen, dass neuronale Zelllinien (N1E-115), die ein PRG-1-eGFP Fusionsprotein überexprimieren gegen eine durch LPA induzierte Neuritenretraktion geschützt waren und dass weiterhin im Überstand dieser transfizierten Zellen die 5-fache Menge an MAG als LPA Degradationsprodukt nachgewiesen werden konnte als in untransfizierten Zellen [1]. Um zu zeigen, dass dieser Zellphänotyp aufgrund einer Ekto-phosphatase Aktivität von PRG-1 hervorgerufen wird, hatten Bräuer et al. eine Punktmutation in das *prg-1* Transkript kloniert, die an der Phosphatase Domäne D2 ein Histidin zu einem Lysin im PRG-1 Protein austauscht (H253K) und die in den LPP homologen Proteinen, den Drosophila LPPs Wunen, zu einem Verlust der enzymatischen Aktivität führte [1, 99]. Die Transfektion dieses mutierten PRG-1 Konstruktes in N1E-115 Zellen bewirkte nicht den Schutz der Zellen vor der durch LPA induzierte Neuritenretraktion [1]. Weiterhin konnten kein MAG als Abbauprodukt der LPA Dephosphorylierung im Überstand dieser transfizierten Zellen nachgewiesen werden [1]. Bräuer et al. nahmen somit an, dass PRG-1 die durch LPA induzierte Neuritenretraktion durch eine erhöhte Ekto-Phosphatase Aktivität beeinflussen kann [1].

Im Jahr 2004 zweifelten Forscher um Andrew Morris daran, dass PRG-1 eine Lipid Phosphatase sei [101]. Sequenzvergleiche zwischen den Proteinen der PRG-Familie und den bekannten Lipid Phosphatasen, wie zum Beispiel LPP-1 zeigten, dass die Gruppe der PRGs innerhalb der Phosphatasedomänen nicht-konservierte Aminosäureaustausche besitzen [101]. So besitzt zum Beispiel PRG-1 in Domäne 1 und 3 drei nicht-konservierte AS (siehe Abbildung 4) [101], die laut dem von Stukey und Carman (1997) entdeckten Sequenzmotiv essentiell für den Reaktionsmechanismus dieser Phosphatasen sind [30]. Zhang et al. zeigten bereits 2000 an Maus LPP-1, dass die einzelnen Mutation dieser drei Aminosäuren zu einem Verlust der Phosphataseaktivität von LPP-1 führt [7]. Aufgrund dieser Tatsachen wird angenommen, dass PRG-1 nicht diesen LPP Dephosphorylierungsmechanismus durchführen kann, demzufolge keine Lipid Phosphatase

sei und die von Bräuer et al. beobachteten morphologischen Veränderungen in neuronalen Zellen aufgrund anderer biologischer Aktivitäten von PRG-1 erklärt werden müssten [101]. So besitzen im Gegensatz zu neuronalen Zellen nichtneuronalen HEK293 Zellen, wenn sie mit PRG-1-eGFP übertransfiziert werden, keine erhöhte LPA Phosphatase Aktivität [101]. Diese widersprüchlichen Ergebnisse ließen Morris, Brindley und andere Forscher annehmen, dass PRG-1 in einigen Zellen vermutlich die Aktivität von bereits dort existierenden LPPs stimulieren und/oder modulieren könnte, so dass trotz des inkorrekten Phosphatase Motivs in PRG-1 eine erhöhte LPA Phosphatase Aktivität von Bräuer et al. in neuronalen Zellen gemessen werden konnte (Review: [3, 4]). Somit könnte PRG-1 auf durch LPA induzierte Signaltransduktionsvorgänge Einfluss nehmen.

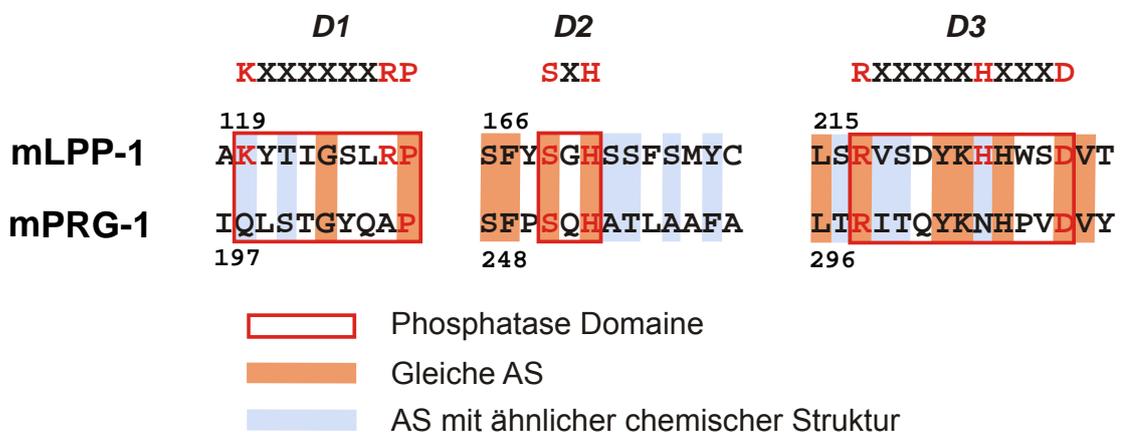


Abbildung 4. Vergleich der AS Sequenzen der Phosphatasedomänen D1-D3 zwischen Maus LPP-1 und Maus PRG-1. Drei nicht-konservierte Aminosäureaustausche in der Phosphatasedomäne D1 und D3 finden sich im PRG-1 Protein, welche in LPP-1 essentiell für die Phosphataseaktivität sind (rote Schrift). (K- Lysin zu Q- Glutamin, R- Arginin zu A- Alanin und H-Histidin zu N- Asparagin).

A.4 Ziel der Arbeit

Ziel der Promotionsarbeit ist es, PRG-1 defiziente Mäuse zu generieren und die Effekte einer *prg-1* Deletion in diesen Mäusen zu analysieren. Auf Grundlage der Analyse dieser PRG-1 Defizienz soll ein Mechanismus postuliert werden, der erklärt, wie PRG-1 auf eine LPA Signaltransduktion modulierend eingreifen könnte.

So sollen zwei Arten von Knockout (KO) Mäusen generiert werden. Neben einem konstitutiven KO, in dem alle Körperzellen von der *prg-1* Deletion betroffen sind, soll ein konditioneller KO generiert werden, in dem zeitlich und gewebespezifisch, durch die Expression der Cre-Rekombinase, das *prg-1* Gen deletiert werden kann. Die KO Mäuse sollen durch allgemeine Beobachtungen der Mauslinie, durch immunhistochemische Analysen und - in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dietmar Schmitz - durch elektrophysiologische Analysen charakterisiert werden. Weiterhin soll der mögliche Effekt der *prg-1* Deletion auf die LPA Signaltransduktion durch (I) Zellkulturexperimente mit KO und Wildtyp (WT) primären Neuronen, (II) durch *in utero* Elektroporationen eines mutierten *prg-1* Konstruktes und (III) durch Verpaarungen der PRG-1-KO Maus mit einer KO Maus für den LPA₂ Rezeptor analysiert werden (siehe Abbildung 5, Seite 24).

B MATERIAL UND METHODEN

B.1 Material

B.1.1 Allgemeine Chemikalien und Reagenzien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden, wenn nicht anderweitig ausdrücklich aufgeführt, von folgenden Herstellern bezogen: BioRad, Gibco, Invitrogen, Merck, PAN, Promega, Roth, Roche, Sigma, Stratagene.

B.1.2 Verwendete Enzyme

Tabelle 1: Enzyme. Die Stock Konzentration jedes Enzyms (Units/ μ l), der verwendete Puffer und der Hersteller ist genannt.

Name	Konz.	Puffer	Hersteller
Restriktionsenzyme			
<i>Apa</i> I	50 U/ μ l	NEB Puffer 4	New England Biolabs
<i>Bam</i> H I	20 U/ μ l	NEB Puffer 2-3	New England Biolabs
<i>Eco</i> R I	20 U/ μ l	NEB Puffer 1-4	New England Biolabs
<i>Eco</i> R V	20 U/ μ l	NEB Puffer 3	New England Biolabs
<i>Hind</i> III	20 U/ μ l	NEB Puffer 2	New England Biolabs
<i>Kpn</i> I	10 U/ μ l	NEB Puffer 1	New England Biolabs
<i>Not</i> I	10 U/ μ l	NEB Puffer 3	New England Biolabs
<i>Pst</i> I	20 U/ μ l	NEB Puffer 3	New England Biolabs
<i>Sac</i> I	20 U/ μ l	NEB Puffer 1	New England Biolabs
<i>Sac</i> II	20 U/ μ l	NEB Puffer 4	New England Biolabs
<i>Spe</i> I	10 U/ μ l	NEB Puffer 2	New England Biolabs
<i>Xba</i> I	20 U/ μ l	NEB Puffer 2	New England Biolabs
<i>Xho</i> I	20 U/ μ l	NEB Puffer 2	New England Biolabs
Polymerasen			
Herculase	5 U/ μ l	Herculase Buffer	Stratagene
GoTaq	5 U/ μ l	GoTaq Buffer	Promega

Name	Konz.	Puffer	Hersteller
Modifizierende Enzyme			
T4-DNA Ligase	400 U/μl	T4 DNA Ligase Puffer	New England Biolabs
Alkalische Phosphatase (SAP)	1 U/μl	SAB Puffer	Promega

B.1.3 Bakterienstämme

Bakterienstämme, die während der Generierung der Targeting Konstrukte und der Klonierung von Plasmid Derivaten benutzt wurden, sind in Tabelle 2 mit ihren Genotypen und Herstellern aufgeführt.

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Hersteller (Ref.)
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ φ80d <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> XL10Gold	<i>endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>tet^R</i> F'[<i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10(Tet^R Amy Cm^R)</i>]	Stratagene
<i>E. coli</i> TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 <i>lacX74 recA1 deoR araD139</i> Δ(<i>araleu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> DY380	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80d <i>lacZ</i> M15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 endA1 araD139</i> Δ(<i>ara, leu</i>) 7649 <i>galU galK rspL nupG</i> [<i>λcI857 (cro-bioA) <> tetI</i>]	Copeland [102]
<i>E. coli</i> EL250	DY380 [(<i>cro-bioA</i>) <> <i>araC-PBADflpe</i>]	Copeland [102]
<i>E. coli</i> EL350	DY380 [(<i>cro-bioA</i>) <> <i>araC-PBADcre</i>]	Copeland [102]

B.1.4 Bakterien Wachstumsmedien und –platten

Tabelle 3: Wachstumsmedien und ihre Herstellungsprotokolle

Name	Zusammensetzung
DYT-Medium	16 g Bacto-tryptone, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, Auffüllen zu 1 L mit H ₂ O, pH 7,0 einstellen und Autoklavieren (DYT = „double-strength yeast extract / tryptone“)
S.O.C. Medium	20 g Bacto-tryptone, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 2,5 mL 1M KCl, Auffüllen zu 1 L mit H ₂ O, pH 7,0 einstellen und Autoklavieren
DYT-Agar	10 g NaCl, 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 20 g Agar, Auffüllen zu 1 L mit H ₂ O, pH 7,0 einstellen, Autoklavieren, abkühlen lassen (40-50°C) Antibiotika in verwendeter Konzentration dazugeben und ca. 20 ml pro Petrischale steril abfüllen.

B.1.5 Antibiotika

Tabelle 4: Antibiotika zur Selektionierung der Bakterienklone

Antibiotika	Konzentration	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml
Kanamycin	12,5 mg/ml in H ₂ O	2,5 µg/ml
Chloramphenicol	34 mg/ml in Ethanol	25 µg/ml

B.1.6 Plasmide / BAC

Tabelle 5. Während dieser Arbeit eingesetzten Plasmide und BAC sind mit ihren Herstellern bzw. Referenzen aufgeführt.

Plasmid	Firma bzw. Referenz
pBluescript SK- (pBSK)	Stratagene. La Jolla, CA, USA.
pIRES-β-Gal-MC1Neo	aus Davies et al. 2004 [103]. Zur Verfügung gestellt von AG Theuring, Charité, Berlin.
pCR2.1-TOPO	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland.
pNeo	aus Liu et al. 2003 [102]. Zur Verfügung gestellt von AG Birchmeier, MDC Berlin.
pDTA	basierend auf pBSK, beinhaltet in MCS DT-A (Diphtheria Toxin Fragment A) Gen unter der Kontrolle des HSV-TK promoters. Zur Verfügung gestellt von AG Birchmeier, MDC Berlin.
pCAG-IRES-GFP	aus Kawauchi 2003 [104]. Zur Verfügung gestellt von AG Parnavelas, UCL, London, Groß Britanien.
pSPT18/19	Roche Applied Sciences, Mannheim, Deutschland.
BAC (RP23-340J18) (Bacterial Artificial Chromosomes)	RZPD, Berlin, Deutschland

B.1.7 Oligonukleotide

Tabelle 6: Oligonukleotide. Restriktionserkennungsstellen (unterstrichen) und Punktmutationen (fett) sind innerhalb der Sequenz dargestellt. Weiterhin ist die jeweilige Annealing Temperatur und die Produktgröße bei der Durchführung der PCR mit den jeweiligen Primerpaaren (gestrichelte Umrandung) angegeben. Sie wurden von der Firma Metabion (München) bezogen (c=100pmol/µl).

Name	Sequenz 5' → 3'	Annealing Temp.	Produkt [bp]
B.1.7.1 Primer zur Herstellung des Targeting Vektors pPRG-1-KO			
PRG1KO-LA_Not1-Fw	<u>GCG GCC GCT</u> TGG ACG GTC CTG GTC TAG GAG AGG	62 °C	1442
PRG1KO-LA_HindIII-Rev	CAT GTT TGA GAG <u>AAA GCT TAG</u> ATG CTG		
PRG1KO-LA_HindIII-Fw	CAG CAT CTA <u>AGC TTT</u> CTC TCA AAC ATG	62 °C	1239
PRG1KO-LA_ApaI-Rev	CTC TCT <u>GGG CCC</u> AGG GAG GAC GAG G		
PRG1KO-LA_ApaI-Fw	CCT CGT CCT CCC <u>TGG GCC CAG</u> AGA G	62 °C	1970
PRG1KO-LA_BamH1-Rev	<u>GGA TCC</u> TGG TGC CTG ATA TCC TGT GGA GAG CTG		
PRG1KO-KA_BamH1-Fw	<u>GGA TCC</u> CGA GGG TGG GGG TGA ACG GAG ATC	62 °C	1313
PRG1KO-KA_Sal1-Rev	<u>GTC GAC</u> GCA TGG CCT CTG CTG TTG GGA AAA CC		
B.1.7.2 Primer zur Amplifikation der Southern Blot Sonden für PRG-1-KO			
PRG1KO-SB-5'Probe-Fw	AGG TGG CAA TAA GCA ATG GAG	60 °C	518
PRG1KO-SB-5'Probe -Rev	GTG GGG GTA GAA GAA ATA GCA GC		
PRG1KO-SB-3'Probe-Fw	TGC CAA GAG AGG GGG AGG GGG AG	60 °C	328
PRG1KO-SB-3'Probe -Rev	AGC GGG GAC ATT GTG ACA GGG GTG		
B.1.7.3 Primer zur Amplifikation der internen Northern Blot Sonde P1 für PRG-1-KO			
PRG1KO-NB-P1-HindIII-fw	TA AAG CTT CGT GGA AGA TAT TTG TTC AGG	60 °C	634
PRG1KO-NB-P1-EcoRI-rev	TA GAA TTC CAT AGA GGC ATG GAT GCT CG		
B.1.7.4 Primer zum Screening der PRG-1-KO ES-Zellen			
PRG1KO-kPCR-Fw	TCG CCT TCT ATC GCC TTC TTG AC	63 °C	-
PRG1KO-KA_Sal1-Rev (1)	<u>GTC GAC</u> GCA TGG CCT CTG CTG TTG GGA AAA CC		
PRG1KO-kPCR-Rev (2)	CCA CTA CAG GGA AGC CAA GAA TG		
PRG1KO-kkPCR-Rev (3)	CTC AAA GCC CTG TCC AAT TCA TCC		
B.1.7.5 Primer zur Genotypisierung der PRG-1-KO Mäuse			
Neo-gPCR-Fw (1)	GGG CTG ACC GCT TCC TCG TGC TTT AC	63 °C	305
PRG1-gPCR-Fw (2)	CCG TGA TTG CTT GTT CCT TCT AGT GTG		
PRG1-gPCR-Rev (3)	TCG GGG ATG TGC ACC AAT TGG GAA GAG		
B.1.7.6 Primer zur Herstellung des Targeting Vektors für pPRG1cKO			
Oligos für die Umklonierung des BACs in pDTA			
PRG1cKO-5'Spel-Fw	<u>ACT AGT</u> GTT AGT CAT TTA TTG ATA AG	61 °C	500
PRG1cKO-5'Hind3-Rev	<u>AAG CTT</u> TGA CTC TTC CAG TGA CAC AC		

Name	Sequenz 5' → 3'	Annealing Temp.	Produkt [bp]
PRG1cKO-3'Hind3-Fw	<u>AAG CTT</u> GAG GAG ACC CAG GAA AAC ATA AG	50 °C	500
PRG1cKO-3'XhoI-Rev	<u>CTC GAG</u> GTG GTG ATG CCG TGG TGG TG		

Oligos für die Klonierung der ersten Lox Site mittels pNeo

PRG1-Lox1-5'Xho-Fw	<u>TCT C GA GCA</u> GAG GAC CCA GGT TCA GAA C	60 °C	300
PRG1-Lox1-5'SpeHind-Rev	<u>TAA GCT TAC TAG TAT</u> GTG ACC TTA TAG AGC ACT G		
PRG1-Lox1-3'SacII-Fw	<u>TCC GCG GAT</u> CAG TGT ACG ATA TGC ATA G	60 °C	300
PRG1-Lox1-3'SacI-Rev	<u>TGA GCT CTA</u> AAG TTC TGC TTT CAA CCT G		

Oligos für die Klonierung der zweiten Lox Site mittels pNeo

PRG1-Lox2-5'Xho-Fw	<u>TCT CGA GGA</u> TAA CTC AAT ATA AGA ACC	60 °C	300
PRG1-Lox2-5'PstI-Rev	<u>TCT GCA GTC</u> CAA TGA TCC TCA ACT GAT G		
PRG1-Lox2-3'SacII-Fw	<u>TCC GCG GTT</u> TCA GTC TTA AAG TAA GCA C	60 °C	300
PRG1-Lox2-3'SacI-Rev	<u>TGA GCT CTT</u> ATC TAG AAG ATG TTT AGC		

B.1.7.7 Primer zur Amplifikation der Southern Blot Sonden für PRG-1 cKO

PRG1cKO-SB-5'Probe -Fw	CAT TAT ATG AAC GGT TTG TTT CTG	61 °C	1009
PRG1cKO-SB-5'Probe -Rev	GCA AGC CTT AAT GTA TTA CAG		
PRG1cKO-SB-3'Probe -Fw	CCC TAG AAG ATA TGG AGA GC	61 °C	546
PRG1cKO-SB-3'Probe -Rev	CAA CTG TGA GAG AGC CAC TAC		

B.1.7.8 Primer zur Genotypisierung der PRG1cKO Maus

Amplifikation des Locus der 1. Lox site

PRG1cko-gPCR-Lox1-Fw (1)	CCC TGT TAA GAA TTG ACC	58 °C	698 WT 771 Lox1
PRG1cko-gPCR-Lox1-Rev (2)	GAC ATG ACA CAA ATA TCA GGG		

PCR von Intron 6 zu Intron 3 nach Deletion von Exon 4-6 durch Cre Rekombinase

gPCR PRG1cKO -/- fw (3)	GTT ATG TTG CAC TTA CAT ATC AGT GTA G	58 °C	180
gPCR PRG1cKO -/- rev (4)	CAC ACA CAG TGC TTA CTT TAA GAC TG		

B.1.7.9 Primer zur Amplifikation des murinen PRG-1 Gens und Klonierung in pCAG

mPRG1-ClaI-Fw	<u>AAT CGA TGC</u> AGC GCG CTG GTT CCA GC	63	2311
mPRG1-BamStop-Rev	<u>AGG ATC CTC</u> AAT CCT TAT AAG CCC GCG TG		

B.1.7.10 Primer zur Amplifikation der DIG-RNA Sonden aus dem PRG-1 Gen

PRG1-DIG-E7-1-Hind3-Fw	<u>TAA AGC TTC</u> GTG GAA GAC CCA GTG AGA AG	60	340
PRG1-DIG-E7-1-EcoRI-Rev	<u>TAG AAT TCG</u> ATG TGC ACC AAT TGG GAA G		
PRG1-DIG-E7-2-Hind3-Fw	<u>TAA AGC TTG</u> AGG AGA CCC AGG AAA ACA TAA G	60	400
PRG1-DIG-E7-2-EcoRI-Rev	<u>TAG AAT TCC</u> CTG TTG AGG TCG TTG AGC		

B.1.7.11 Primer zur Einführung von Punktmutationen in das murine PRG-1 Gen

Mut-mPRG1-H253K-Fw	GTC ATT CCC ATC CCA AAA GGC GAC CCT CGC TGC
Mut-mPRG1-H253K-Rev	GCA GCG AGG GTC GCC TTT TGG GAT GGG AAT GAC

B.1.8 Antikörper

Tabelle 7: Antikörper. Ihre jeweiligen Herkunftsspezies, Hersteller und eingesetzte Verdünnung der jeweiligen Anwendungen sind aufgeführt (WB - Western Blots, IHC – Immunhistochemie).

Name	Herkunft Spezies	Hersteller	Verdünnung
Primäre Antikörper			
Anti-β-Actin	Maus, monoklonal	Sigma	1:5000 WB
Anti-bact-β-Gal	Huhn, polyklonal	Abcam	1.1000 IHC
Anti-Calbindin	Maus, monoklonal	Swant	1:5000 IHC
Anti-Calretinin	Kaninchen, polyklonal	Swant	1:5000 IHC
Anti-Gad67	Maus, monoklonal	Chemicon	1:1000 IHC
Anti-GFAP	Kaninchen, polyklonal	DAKO	1:1000 IHC
Anti-GFP	Kaninchen, polyklonal	Abcam	1:1000 IHC
Anti-GluR1	Kaninchen, polyklonal	Chemicon	1:1000 IHC
Anti-GluR2	Maus, monoklonal	Chemicon	1:1000 IHC
Anti-GluR2/3	Kaninchen, polyklonal	Chemicon	1:1000 IHC
Anti-GluR4	Kaninchen, polyklonal	Upstate	1:1000 IHC
Anti-Ibal	Kaninchen, polyklonal	Wako Chemicals GmbH	1:1000 IHC
Anti-NeuN	Maus, monoklonal	Chemicon	1:1000 IHC
Anti-NPY	Kaninchen, polyklonal	Chemicon	1:1000 IHC
Anti-NR1	Maus, monoklonal	Synaptic Systems	1:500 WB, 1:1000 IHC
Anti-Parvalbumin	Kaninchen, polyklonal	Swant	1:5000 IHC
Anti-PRG-1	Kaninchen, polyklonal	Eigene Herstellung	1:500 WB, 1:250 IHC
Anti-PSD95	Maus, monoklonal	Chemicon	1:500 WB, 1:1000 IHC
Anti-Syn	Maus, monoklonal	Synaptic Systems	1:10000 WB, 1:1000 IHC
Anti-VGat	Maus, monoklonal	Synaptic Systems	1:500 WB, 1:1000 IHC
Anti-VGlut1	Maus, monoklonal	Synaptic Systems	1:500 WB, 1:1000 IHC
Sekundäre Antikörper			
Anti-Huhn-Alexa568	Ziege	Vector	1:1000 IHC
Anti-Kaninchen-biot.	Ziege	Vector	1:1000 IHC
Anti-Kaninchen-Alexa488	Ziege	Molecular Probes (Invitrogen)	1:1000 IHC
Anti-Kaninchen-Alexa568	Ziege	Molecular Probes (Invitrogen)	1:1000 IHC
Anti-Maus-biot.	Ziege	Vector	1:1000 IHC
Anti-Maus-Alexa488	Ziege	Molecular Probes (Invitrogen)	1:1000 IHC
Anti-Maus-Alexa568	Ziege	Molecular Probes (Invitrogen)	1:1000 IHC

B.1.9 Puffer und Lösungen

B.1.9.1 Agarose Gel Elektrophorese

10x TBE-Puffer (TRIS-Borat-EDTA-Puffer):	108 g Tris, 55 g Borsäure, 40 ml EDTA 0,5 M pH8,0, auffüllen auf 1 l mit dH ₂ O.
10x TBE-Guanosin Puffer:	10x TBE Puffer mit 2,83 g Guanosin.
10x Ladepuffer:	50 g Saccharose, 0,25 g Bromphenolblau, auffüllen auf 100 ml mit 1 x TBE-Puffer.
Ethidiumbromid Farbe Lösung:	5 mg / ml EtBr in H ₂ O.

B.1.9.2 Plasmid Extraktion

TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl pH 7,2, 10 mM EDTA.
Miniprep-Lösung E1:	10 mM EDTA pH 8,0, 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 µg/mL Rnase A, 100 µg/mL Lysozym.
Miniprep-Lösung E2:	1% (w/v) SDS, 0,2 M NaOH.
Miniprep-Lösung E3:	3 M Kaliumacetat, 11,5 % Essigsäure.

B.1.9.3 Isolierung genomischer DNA

0,5% SDS-Extraktionspuffer:	0,10 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 25 mM EDTA, 0,5 % SDS.
Proteinase K Lösung:	10 mg/ml
RNase A Lösung:	5 mg/ml

B.1.9.4 Northern Blot und Southern Blot Puffer

10x MOPS Lauf Puffer:	50 mM NaOAc, 0,2 M MOPS pH 7,0, 10 mM EDTA.
1,5x Lade Puffer:	750 µl Formamid, 75 µl 37% Formaldehyd, 150µl 10x MOPS Lauf Puffer, 15 µl Ethidiumbromidlösung (5 mg/ml), 10 µl H ₂ O.
Depurinierungspuffer:	10 ml 12N HCl in 500 ml H ₂ O (0,24 M HCl).
Denaturierungspuffer:	0,05 M NaOH, 1,5 M NaCl.
Neutralisierungspuffer:	0,5 M Tris-HCl pH 7,4, 1,5 M NaCl.
20x SSC:	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7.4 einstellen.
Hybridisierungspuffer:	44,1 ml H ₂ O, 225 ml 1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,2, 0,9 ml 0,5 M EDTA pH 8,0, 630 ml 10 % SDS, 9 g BSA.
Waschpuffer 1:	2x SSC, 0,1 % (w/v) SDS.
Waschpuffer 2:	0,2x SSC, 0,1 % (w/v) SDS.

B.1.9.5 Proteinisolierung und Western Blot Puffer

Proteinisolierungspuffer aus Gehirnhomogenat:	10 ml 20 mM Tris pH 7,5, 0,86 g Saccharose (0,25 M), 20 µl 0,5 M EGTA (1 mM), 100 µl 0,5 M EDTA (5 mM), 100 µl Proteinase Inhibitor Cocktail (Sigma, Kat.Nr. P8340).
Homogenisierungspuffer für Synaptosomenpräparation:	320 mM Saccharose, 4 mM HEPES, pH 7,4 mit NaOH einstellen, 1:1000 Proteinase Inhibitor Cocktail (Sigma, Kat.Nr. P8340)
3x Probenpuffer:	60 mM Tris, 10% (w/v) Saccharose, 10% (w/v) SDS,

	5 mg Bromphenolblau, Auffüllen auf 10ml mit H ₂ O.
Proteinverdünnungspuffer:	20 mM Tris-HCl, pH 7,5.
Sammelgel Puffer Tris I:	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,4 % (w/v) SDS.
Trenngel Puffer Tris II:	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,4 % (w/v) SDS.
Sammelgel 3,75%:	1,5 ml Tris I, 750 µl Acrylamid, 300 µl Bisacrylamid, 3,45 ml H ₂ O, 7,8 µl TEMED, 60 µl 10% Ammoniumpersulfat (APS).
Trenngel 10%:	3 ml Tris II, 4 ml Acrylamid, 1,6 ml Bisacrylamid, 3,4 ml H ₂ O, 16 µl TEMED, 120 µl 10% APS.
10x SDS-PAGE Laufpuffer:	0,25 M Tris, 1,92 M Glycin, 1% (w/v) SDS.
Semi-dry Transfer Puffer:	192 mM Glycin, 25 mM Tris, 20% (v/v) Methanol.
10x Ponceau Lösung:	0,02 % (w/v) Ponceau S (Merk, Kat. Nr. 14275), 0,3 % (w/v) Trichloressigsäure.
10x PBS, pH 7,4:	2 g KCl, 2 g KH ₂ PO ₄ , 80 g NaCl, 14,4 g Na ₂ HPO ₄ ·xH ₂ O, Auffüllen auf 1 l mit H ₂ O.

B.1.9.6 Immunhistochemische Puffer und Lösungen

0,1 M PB Puffer pH 7,4:	80,2 ml 1 M K ₂ HPO ₄ , 19,8 ml 1 M KH ₂ PO ₄
Narkoselösung:	10 ml Ketamin (CuraMED Pharma, Kat. Nr. 8614224), 4 ml Rompun (Bayer Health Care, Kat. Nr. 35464), 36 ml 0,9% NaCl.
4% PFA Lösung:	4 g Paraformaldehyd in 50 ml H ₂ O und 1 ml 1 M NaOH bei 60°C lösen, 10 ml 10x PBS, mit ca. 1ml 1M HCl pH 7,4 einstellen, auf 100 ml mit H ₂ O auffüllen und filtrieren durch Faltenfilter.
Tyrode Lösung:	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1 mM MgCl ₂ , 1,8 mM CaCl ₂ , 0,2 mM Na ₂ HPO ₄ , 12 mM NaHCO ₃ , 5,5 mM D-Glucose.
Blockierungslösung:	0,1 % (v/v) Triton X-100, 5 % (v/v) Normal Goat Serum (NGS).

X-Gal Färbung

X-Gal Färbepuffer:	5 mM Kaliumhexacyanidoferrat(II) (K ₄ [Fe(CN) ₆]), 5 mM Kaliumhexacyanidoferrat(III) (K ₃ [Fe(CN) ₆]), 1 mM MgCl ₂ , 0,01 % (v/v) Natrium-Deoxycholate, 0,02 % (v/v) Nonidet-P40 in 1x PBS.
X-Gal Lösung:	40 mg X-Gal (Roth Kat Nr. 2815.3) in 1 ml DMSO.

TIMM Färbung

Soerenson Puffer 0,15 M:	19,6 ml 0,15 M KH ₂ PO ₄ , 80,4 ml 0,15 M Na ₂ HPO ₄ , pH 7,4.
Fixativ I:	1,17 % (w/v) Natriumsulfid (Merk Kat. Nr. 6638), 1,2% (w/v) Natriumdihydrogenphosphat.
Fixativ II:	2,5 % (v/v) Glutaraldehyd in Soerenson Puffer, pH 7,4.
Gum Arabic Lösung:	30 % (w/v) Gum Arabic (Sigma Kat. Nr. G-9752).
Entwicklerlösung:	2,55 % (w/v) Citronensäure-Monohydrat, 2,35 % (w/v) Natriumcitrat, 1,7 % (w/v) Hydrochinon, 60 % (v/v) Gum Arabic Lösung, 0,085 % (w/v) Silbernitrat.
Natriumthiosulfat Lösung:	1% (w/v) Natriumthiosulfat-Pentahydrat.

In situ Hybridisierung

Waschlösung:	PBS mit 0,05 % (v/v) Tween20.
Acetylierungslösung:	0,1 M Triethanolamin-hydrochlorid (Sigma, Kat. Nr. T9534), pH 8,0 (mit NaOH), 0,25 % (v/v) Essigsäureanhydrid.

PK Puffer:	100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA pH 8,0 (autoklavieren), vor Gebrauch 0,05 % (v/v) Tween 20 zugeben.
Hybridisierungslösung:	100 mg/ml Dextransulfat, 0,3 M NaCl, 0,02 M Tris, pH 8, 5 mM EDTA, pH 8, 1x Denhardt's-Lösung (50x), 0,5 mg/ml t-RNA, 50 % (v/v) Formamid (deionisiert)
SSC Waschpuffer I:	5x SSC, 0,05 % (v/v) Tween20.
SSC Waschpuffer II:	0,1x SSC, 0,05 % (v/v) Tween20.
Formamid I Waschpuffer:	50 % Formamid (deionisiert, Roth Kat. Nr. P040.1), 2x SSC, 0,05 % Tween 20.
Formamid II Waschpuffer:	50 % Formamid (deionisiert, Roth Kat. Nr. P040.1), 1x SSC, 0,05 % Tween 20.
10x TN-Puffer:	1 M Tris-HCl, 1,5 M NaCl, pH 7,5 mit NaOH einstellen, autoklavieren, für 1x Gebrauchslösung 0,05 % (v/v) Tween 20 zugeben
10x Maleatpuffer:	1 M Maleinsäure, 1,5 M NaCl, pH 7,0 mit NaOH einstellen, autoklavieren, für 1x Gebrauchslösung 0,05 % (v/v) Tween 20 zugeben.
AP Substratpuffer:	0,2 M Tris-HCl pH 9,5, 0,1 M NaCl, 10,2 g/l MgCl ₂ .
Färbelösung:	1 % (v/v) NBT/BCIP (Roche, Kat Nr. 11681451001) in AP Substratlösung, 0,1 % (v/v) 1 M Levamisol (Sigma, Kat. Nr. L-9756)

DAB-Färbung

ABC-Lösung: (VECTASTAIN [®] , Vector)	0,5 % (v/v) Reagenz A, 0,5 % (v/v) Reagenz B in 0,1 M PB Puffer mischen und 30 min bei RT inkubieren
DAB-Lösung:	17,5 mg DAB (Sigma, Kat. Nr. D5637) in 25 ml 0,1 M PB Puffer lösen, 1 min Ultraschallbad, Filtrieren und kalt stellen (4 °C). Zur Verstärkung des DAB Signals wurden 100µl 1% CoCl ₂ x6H ₂ O, 80µl 1% H ₈ N ₂ NiO ₈ S ₂ x6H ₂ O auf 10ml DAB-Lösung pipettiert.

B.1.9.7 Puffer für die Herstellung primärer neuronaler Zellkulturen

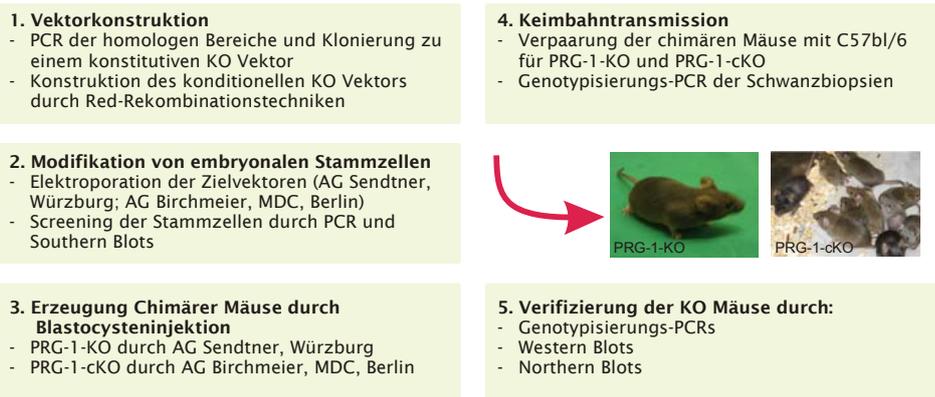
Poly-L-Lysin in Boratpuffer:	0,2 mg/ml Poly-L-Lysin (Sigma, Kat. Nr. P2636) in 0,1 M Borsäure, pH 8,5.
Plating Medium:	3 ml 20% Glukose, 10 ml Pferdeserum (Gibco, Kat Nr. 26050-088), auffüllen auf 100 ml mit MEM Medium (Gibco, Kat. Nr. 31095-052), steril filtrieren.
Wachstumsmedium:	1 ml B27 Supplement (50x) (Gibco, Kat. Nr. 17504-044), 125 µl 200mM L Glutamin (Gibco, Kat. Nr. 25030-024), 0,5 ml Penicillin/Streptomycin (PAN-Biotech), auffüllen auf 50 ml mit Neurobasal™ Medium (Gibco, Kat. Nr. 26050-088).

B.2 Methoden

B.2.1 Fließschema

Abbildung 5 veranschaulicht die wesentlichen Methoden, die in dieser Arbeit zur Generierung von PRG-1 defizienten Mäusen führten und die durchgeführten Experimente zur Analyse der Auswirkung einer PRG-1 Defizienz.

1. Generierung der KO Mäuse



2. Phänotypisierung der KO Maus

1. Allgemeine Beobachtungen

Expressionsanalyse von PRG-1 in heterozygoten PRG-1-KO Mäusen

- X-Gal/ β -Gal Färbungen
- DIG-insitu Hybridisierungen

Beobachtungen zu PRG-1-KO Maus

- Sterberate / Wachstumskurve
- Konvulsive Anfälle
- In vivo EEG Aufnahmen (AG Schmitz)
- Induzierung der Anfälle durch Kainatapplikationen

2. Immunhisto- und biochemische Analysen

Expression von prä- und postsynaptischen Markern bei P21

- Immunhistochemische Färbungen
- Western Blots von Synapsenpräparationen

Postepileptische Veränderungen

- Hippocampale immunhistochemische Färbungen von 4 Monate alten Tieren

3. Elektrophysiologische Analysen

An hippocampalen Schnitten (In Kooperation mit AG Schmitz, NWFZ, Charité, Berlin)

- fEPSP Messungen
- Intrinsische Eigenschaften der Zellen
- EPSC, Miniatur mIPSCs und mEPSC

In utero Elektroporationen (IUE)

- Vektorkonstruktion für IUE (PRG-1 und Cre)
- Elektroporation von PRG-1 in PRG-1-KO Embryos und Cre in PRG-1-cKO Embryos
- Messung der mEPSCs (AG Schmitz)

4. Effekte auf die LPA Signaltransduktion

Zellkulturrexperimente mit primären Neuronen

- Lipid Aufnahmeexperimente

In utero Elektroporationen (IUE)

- Vektorkonstruktion für IUE (mutiertes PRG-1)
- Elektroporation von PRG-1 H253K
- Messung der mEPSCs (AG Schmitz)

Einkreuzen der LPA₂-Rezeptor KO Maus

- Beobachtungen zur PRG-1/LPA₂ KO Maus
- Elektrophysiologische Analyse der PRG-1/LPA₂ KO Maus (fEPSPs, mEPSCs, EEG Aufnahmen, AG Schmitz)

Abbildung 5. Fließschema der Arbeit. Die Arbeit gliedert sich in die Generierung und die Phänotypisierung der KO Mäuse. Die einzelnen Schritte zur Generierung der KO Mäuse (PRG-1-KO konstitutiver KO, PRG-1-cKO konditioneller KO) sind dargestellt. Weiterhin sind die in dieser Arbeit beschriebenen Analysen zur Phänotypisierung der Auswirkungen der PRG-1 Defizienz dargestellt. Die während dieser Arbeit eingegangenen Kooperationen sind in den betreffenden Schritten aufgeführt.

B.2.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden

B.2.2.1 Auftrennung von DNA mittels Agarose Gel Elektrophorese

Die Agarose Gelelektrophorese ermöglicht die elektrophoretische Auftrennung von DNA Fragmenten nach ihrer Größe. Durch den Einsatz von Markern, die DNA Fragmente definierter Größe und Masse besitzen, konnten die untersuchten DNA Fragmente in ihrer Größe und Masse charakterisiert werden.

Es wurden 0,7 bis 2 %ige Agarosegele in 1x TBE bzw. 1x TBE-Guanosin Puffer hergestellt (Volumen: 60 ml, 120 ml, 600 ml; Zusammensetzung siehe B.1.9.1). Nachdem die DNA in 1x Ladepuffer (siehe B.1.9.1) in die Geltaschen pipettiert wurde, erfolgte die Elektrophorese in 1xTBE bzw. 1x TBE-Guanosin Puffer bei einer angelegten Spannung von 40 V (Gellauf über Nacht (>14h), bei Southern Blot Gelen) bis zu 130 V (1-3 h, Plasmid DNA, PCR Fragmente) in Elektrophoresekammern von BioRad und VWR. Als Marker wurde 5 µl Hyperladder I oder 10 µl Hyperladder VI (Bioline, Luckenwalde, Deutschland) verwendet. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mittels einer CCD Kamera und des Programms CamWare V1.10 fotografiert und ausgewertet.

B.2.2.2 Aufreinigen von DNA Fragmenten

Um DNA Fragmente für nachfolgende Anwendungen aus Agarose Gelen zu isolieren oder von Enzymen oder dNTPs zu reinigen, wurde das NucleoSpin[®] Extract II Kit der Firma Macherey-Nagel verwendet. Die Agarose wird hierbei durch eine chaotrope Salzlösung irreversibel geschmolzen. Die DNA ist in Anwesenheit der Salze in der Lage, an eine Silika Filtermembran zu binden, während aufgelöste Agarosereste nicht binden und innerhalb einer Säule abzentrifugiert werden können. Mit Hilfe des Kits konnten Fragmentgrößen von 65 bp bis zu 10 kb extrahiert werden.

Das DNA Fragment wurde mittels eines Skalpell aus dem Agarose Gel ausgeschnitten, gewogen und in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Pro 100 mg Agarose Gel (oder pro 100 µl DNA Lösung (z.B. PCR Ansatz)) wurden 200 µl NT Puffer auf die Agarose pipettiert und für 10 min bei 50 °C inkubiert. Anschließend wurde die aufgelöste Agarose auf eine Spin Filter Säule pipettiert und für 1 min bei 11000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und die Säule wurde in einer erneuten Zentrifugation (1 min, 11000 rpm) mit 600 µl NT3 Puffer gewaschen. Daraufhin wurde die Silikamembran für 2 min bei 11000 rpm getrocknet, so dass in einem nächsten Schritt die DNA mittels 15-50 µl Elutionspuffer NE (oder H₂O) in Lösung geht (1 min Inkubation bei RT) und aus der Membran eluiert werden konnte (1 min, 11000 rpm).

B.2.2.3 Phenol/Chloroform Extraktion

Zur Aufreinigung von Nukleinsäuren aus proteinhaltigen Lösungen, wie Gewebelysaten, wurde eine Phenol Chloroform Extraktion durchgeführt. Dazu wurde die Lösung mit dem gleichen Volumen Phenol versetzt und 20 s stark gemischt. Nach einer Zentrifugation von 10 min bei 14000 rpm bildeten sich 3 Phasen; die hydrophobe phenolische Phase, eine weiße Interphase mit denaturierten Proteinen und eine obere wässrige Phase, in der Nukleinsäuren aufgrund ihrer hydrophilen Gruppen gelöst vorlagen. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt (15 ml Falkon Röhrchen, oder 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß) und mit einem gleichen Volumen eines Phenol:Chloroform Gemisches (1:1) stark gemischt (20 s). Nach einer Zentrifugation von 10 min bei 14.000 rpm wurde die obere wässrige Phase erneut in ein neues Gefäß überführt und mit dem gleichen Volumen Chlorform versetzt, um die wässrige Lösung von restlichem Phenol zu befreien. Nach gründlichem Vortexen beider Phasen und erneuter Zentrifugation (10 min, 14000 rpm), wurde die wässrige obere Phase abgenommen und die in ihr gelösten Nukleinsäure präzipitiert (siehe B.2.2.4) und in TE Puffer gelöst.

B.2.2.4 Ethanol-Natriumacetat-Fällung

Um Nukleinsäuren aus einer wässrigen Lösung zu präzipitieren, wurde eine Ethanol-Natriumacetat Fällung durchgeführt. Dazu wurde die wässrige Lösung mit dem 0,1-fachen Volumen einer 3 M Natriumacetat Lösung (pH5,3) und dem 2,5-fachen Volumen 96 % igem Ethanol versetzt.

Genomische DNA konnte durch vorsichtiges Mischen der Lösung leicht zum Ausfallen gebracht werden. Das sich bildende DNA-Knäuel wurde in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß mittels einer Pipettenspitze überführt, mit 1 ml 70 % igem Ethanol gewaschen und 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Das DNA Pellet wurde an der Luft getrocknet und anschließend in TE Puffer resuspendiert (100 - 200 µl).

DNA Fragmente, Plasmid DNA oder RNA wurden für 5 min auf Eis inkubiert und in einer 30minütigen Zentrifugation bei 14000 rpm präzipitiert. Der Überstand wurde dekantiert und das erhaltende Pellet mit 70 % igem Ethanol gewaschen, 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert, an der Luft getrocknet und in dem jeweiligen Puffer resuspendiert.

B.2.2.5 Bestimmung der Konzentration von DNA und RNA

Die Konzentrationen von DNA oder RNA Lösungen wurden photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt (Photometer Pharmacia Biotech Ultraspec 2000). Eine Extinktion von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml RNA. Mit Hilfe dieses Verhältnisses und des

eingesetzten Verdünnungsfaktors (VF) der Lösung ließ sich die Konzentration spektrometrisch bestimmen ($c = OD_{260} \cdot 50 \mu\text{g}/\text{ml} \cdot VF$). Die Reinheit der Nukleinsäurelösung in Hinblick auf Proteinkontaminationen wurde durch das Verhältnis der Extinktion bei 260 nm (Nukleinsäuren) und der Extinktion bei 280 nm (Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäurereste) bestimmt (DNA 1,8 = rein, RNA 2,0 = rein). Da RNA Verunreinigungen die Extinktion von DNA Lösungen bei 260 nm beeinflussen können und die dabei ermittelten DNA Konzentrationen fehlerhaft sind, wurde zusätzlich die Konzentration der DNA oft mittels Agarose Gel Elektrophorese bestimmt (siehe B.2.2.1).

B.2.2.6 Herstellung transformationskompetenter Zellen

Um *E. coli* Zellen mit Plasmid DNA zu transformieren, mussten die Zellen vorher so behandelt werden, dass eine Transformation ermöglicht werden konnte. Derart kompetente Zellen wurden nach zwei verschiedenen Methoden hergestellt. Zum einen durch chemische Behandlung der Zellen, welches ein Eindringen der DNA durch einen Hitzeschock (42 °C) ermöglicht, und zum anderen durch Auswaschen von störenden Salzlösungen, um das Eindringen von DNA durch eine Elektroporation zu ermöglichen.

B.2.2.6.1 Hitzekompetente Zellen

1 L DYT Medium wurden mit 5 ml einer dicht gewachsenen Bakterienkultur (über Nacht Kultur) beimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,5 bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 5 min in Eiswasser abgekühlt und in vier vorgekühlte 250 ml Zentrifugenbecher überführt. Die Zellen wurden nun für 5 min bei 5000 rpm und 0 °C zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5402). Jedes der vier Zellpellets wurde mit 75 ml Tfb I Puffer resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (15 min, 3000 rpm, 0 °C) wurden die Zellpellets in je 10 ml Tfb II Puffer resuspendiert, in 50 ml Falcon Röhrchen überführt und erneut zentrifugiert (15 min, 3000 rpm, 0 °C). Die Pellets wurden nun in 2 ml Tfb II Puffer resuspendiert und zu 400 μl Aliquots in flüssigem Stickstoff Schock gefroren und bei -80 °C gelagert.

B.2.2.6.2 Elektrokompente Zellen

Die Herstellung von elektrokompenten Zellen erfolgte durch Animpfen von 100 ml DYT Medium mit 100 μl einer dicht gewachsenen Übernacht-Kultur. Nach der Inkubation der Zellen bei 32 °C bzw. 37 °C (abhängig vom Bakterienstamm), bis zu einer OD_{600} von 0,6, wurde die Zellsuspension 5 min auf Eiswasser abgekühlt, in zwei 50 ml Falcon Röhrchen überführt und in einer Zentrifuge (Eppendorf Zentrifuge 5402) pelletiert (11000 rpm, 1 min, 4°C). Die Pellets wurden anschließend in einem 2 ml Mikroreaktionsgefäß durch Resuspension mit 2 ml 10 %iger eiskalter Glycerinlösung vereint. Nach dreimaligen

Waschen der Zellen durch Zentrifugation (1 min, 11000 rpm, 4 °C) und Resuspension mit 2 ml 10 %iger Glycerinlösung, wurden sie erneut zentrifugiert (1 min, 11000 rpm, 4 °C) und in 30 µl 10 %iger Glycerinlösung resuspendiert. 40 µl der Zellsuspension wurden in Mikroreaktionsgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

B.2.2.7 Transformation von *E.coli* Zellen

B.2.2.7.1 Hitzetransformation

Bei der Hitzetransformation wurden 400 µl hitzekompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 10 bis 100 ng Plasmid DNA (1 bis 10 µl) bzw. 20 µl Ligationsansätze (bzw. 2µl TOPO-TA cloning Ansatz) vorsichtig vermischt und auf Eis weitere 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 s bei 42 °C inkubiert, gefolgt von einer weiteren zweiminütigen Inkubation auf Eis. Nun wurden die Zellen mit 900 µl DYT –Medium gemischt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Suspension für 30 s bei 14000 rpm pelletiert und in 250 µl DYT resuspendiert. Zur Selektion auf transformierte Bakterien, die die Antibiotika-Resistenzgene der entsprechend eingeführten Plasmide besaßen, wurden 50 bzw. 200 µl Bakterienzellen auf zwei Agarplatten ausplattiert, welche das entsprechenden Antibiotikum enthielten, und übernacht bei 37 °C bzw. 32 °C (abhängig vom Bakterienstamm) inkubiert.

B.2.2.7.2 Elektrotransformation

Vor der eigentlichen Elektrotransformation mussten die zu elektroporierenden DNA-Lösungen entsalzt werden, so dass eine möglichst hohe Spannung aufgrund eines hohen Widerstandes an der Elektroporationsküvette angelegt werden konnte. Zur Entsalzung wurde die DNA Lösung vor dem Mischen mit den Zellen einer Mikrodialyse unterzogen. Dazu wurde die Lösung auf eine Membran (Millipore, Kat. Nr. NY8H02500) pipettiert, welche in einem mit Millipore II Wasser gefüllten Gefäß auf der Wasseroberfläche aufgrund der Oberflächenspannung schwamm. Nach 30 min wurde die DNA Lösung von der Membran in die auf Eis bereitgestellte 40 µl elektrokompente Bakteriensuspension pipettiert und für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (BioRad, Kat. Nr. 1652089) überführt und in einem Elektroporator (BioRad, Gene Pulser® II) bei 1,8 kV, 800 Ohm und 25 µF mit der DNA elektroporiert. Daraufhin wurden die Zellen sofort mit 1 ml DYT Medium aus der Küvette in ein neues 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß pipettiert und für 1 h bei 32 °C bzw. 37 °C inkubiert (Abhängig vom *E.coli* Stamm). Das Ausplattieren der Zellen erfolgte wie bereits beschrieben (siehe B.2.2.7.1).

B.2.2.8 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, polymerase chain reaction) ist ein Standardverfahren zur selektiven Amplifizierung definierter DNA-Sequenzen durch den Einsatz von zwei Oligonukleotiden (Primern) und einer hitzestabilen Polymerase. Die Primer sind dabei komplementär zum jeweiligen 3'-Ende der einzelnen DNA Stränge der zu amplifizierenden Doppelhelix. In Tabelle 8 sind die wesentlichen Abläufe einer Standard PCR aufgezeigt. Der Doppelstrang wird zunächst aufgeschmolzen (Denaturierung, 95°C), Primer werden angelagert (Annealing, 55-65°C, abhängig von Länge und GC-Gehalt der Primer) und der Gegenstrang zu jedem Einzelstrang wird ausgehend von dem 3' Ende des Primers durch eine Polymerase neu synthetisiert (68-72°C, je nach Polymerase). Ein typisches PCR-Reaktionsgemisch besaß folgende Inhaltsstoffe: 1 µl Primer 1 (100pM), 1 µl Primer 2 (100pM), 1x Taq-Polymerase-Puffer, 2 µl dNTP (2,5 mM), 1-5 U Polymerase, Template DNA (1-10 ng für Plasmid DNA, 100-200 ng genomische DNA) in einem Gesamtvolumen von 25 µl.

Tabelle 8: Genereller Ablauf eines PCR Programms. Die mit „xx“ gekennzeichneten Temperatur bzw. Zeit sind abhängig von der Primersequenz bzw. der Größe des Produktes.

Schritt	Temp.	Zeit	
1	95 °C	5 min	Initiale Denaturierung
2	95 °C	30 s	Denaturierung
3	xx °C	30 s	Annealing
4	72 °C	xx	Elongation
5	72 °C	5-10min	End-elongation
6	12 °C		Abkühlen

} 25-35 Zyclen

In der vorliegenden Arbeit wurde für Genotypisierungen GoTaq™-Polymerase der Firma Promega verwendet (Kat. Nr. M830B). Für PCR-Fragmente, die für Klonierungen amplifiziert wurden, kam die HotStart und Proof-Reading Polymerase Herculase™ der Firma Stratagene (Kat. Nr. 600312) zum Einsatz.

B.2.2.8.1 TOPO TA Klonierung von PCR Produkten

Mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits der Firma Invitrogene (Kat. Nr. 45-0641) wurden PCR Produkte, die im weiteren Verlauf für Klonierungen eingesetzt wurden, in ein Plasmid über Isomerasen rekombiniert. Durch die anschließende Transformation in E.coli Zellen, konnte das PCR Produkt vermehrt werden.

2 µl aufgereinigtes PCR Produkt (in der Regel 100-200 ng in H₂O) wurden mit 1 µl Salt Lösung, 1 µl Vector (pCR2.1-TOPO) und 2 µl H₂O vermischt und auf Eis für 5 min inkubiert. Anschließend wurden 2µl in TOP10 Zellen (Invitrogene) transformiert (siehe B.2.2.7.1). Erfolgreiche Rekombination der PCR Produkte wurde durch Blau/Weiss Selektion auf den Agarplatten festgestellt.

B.2.2.8.2 Einführen von Punktmutationen

Für die Mutation spezifischer Aminosäuren innerhalb des PRG-1 Proteins wurden Punktmutationen mit Hilfe des QuickChange™ Site Specific Mutagenesis Kit der Firma Stratagene (Kat Nr: 200524) in das *prg-1* Gen eingefügt. Das Prinzip beruht auf der Amplifikation des PRG-1 Expressionsplasmides mittels spezifischer Mutationsprimer (Punktmutationen innerhalb der Sequenz und komplementär zueinander) und einer *PfuUltra*® DNA Polymerase (Stratagene). Dabei entstehen mutierte Plasmide mit offenen Enden der Einzelstränge („Nicks“). Um nun das Ursprungsplasmid von den neu synthetisierten Plasmiden zu trennen, wurde der PCR Ansatz durch das Restriktionsenzym *Dpn I* verdaut. Da das Ursprungsplasmid aus *E. coli* Zellen isoliert worden ist, ist dessen DNA Dam methyliert, welche nur von *Dpn I* erkannt und geschnitten werden kann. Durch die anschließende Transformation von *E. coli* Zellen mit der „genickten“ neu synthetisierten Plasmid DNA erfolgt der „Nick-Repair“ in den *E. coli* Zellen.

1 µl Plasmid DNA (10ng) wurden mit 5 µl 10x Reaktionspuffer, 1 µl Primer 1, 1 µl Primer 2, 1 µl dNTP mix, 49 µl H₂O und 1 µl *PfuUltra* DNA polymerase (2,5 U/µl) in einem PCR Mikroreaktionsgefäß gemischt. Die Amplifikation der Plasmid DNA erfolgte unter folgenden Bedingungen: 95 °C 3 min und 12 Zyklen von 95 °C 30 s, 55 °C 1 min, 68 °C 1 min/kb Plasmidlänge. Anschließend wurde 1 µl *Dpn I* (10 U/µl) zu dem Ansatz pipettiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Mit 2 µl des Ansatzes wurden *E. coli* XL10Gold Zellen hitzetransformiert (siehe B.2.2.7.1).

B.2.2.9 Restriktionsverdau von DNA

In der vorliegenden Arbeit wurde DNA durch Restriktionsendonukleasen behandelt, um Restriktionsanalysen von Plasmid DNA durchzuführen, DNA Fragmente für Klonierungen und für Southern- bzw. Northern- Blot Sonden aus Agarosegelen zu isolieren und genomische DNA für Southern Blot Analysen zu verdauen.

Die Restriktionsenzyme und 10x Puffer wurden ausschließlich von der Firma NEB (New England Biolabs) bezogen (siehe B.1.2). Der Verdau erfolgte je nach Enzym bei 25 °C bzw. 37 °C für 1 h (Plasmid DNA) bzw. über Nacht (genomische DNA). Es wurde je nach DNA-Menge und Aktivität des Enzyms (5-20 U /µl) 0,5 – 5 µl Enzymlösung verwendet. Bei Doppelverdau wurden die von NEB vorgeschlagenden Puffer verwendet.

B.2.3 Isolierung von Nukleinsäuren

B.2.3.1 Minipräparation von Plasmid DNA

Um Plasmid-DNA zu gewinnen, wurde das Prinzip der alkalischen Lyse angewendet. Dabei wurden die Bakterienzellen mit Hilfe von SDS und Natriumhydroxid lysiert, die dabei freiwerdende RNA durch RNase verdaut. Bei dem nachfolgenden, schnellen pH-Wert Umschlag durch Kaliumacetat und Essigsäure renaturiert die Plasmid-DNA wieder und kann in Lösung bleiben, während genomische DNA und Zellbestandteile ausfallen und abzentrifugiert werden können.

4 ml einer Übernachtskultur wurde zweimal jeweils in einem 2 ml Mikroreaktionsgefäß kurz abzentrifugiert (30 s / 14000 rpm, Eppendorf Zentrifuge 5402). Das gebildete Bakterienpellet wurde in 250 µl Puffer E1 mittels eines Vortexers resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension mit 250 µl Puffer E2 versetzt, leicht geschwenkt und ca. 5 min bei RT lysiert, bis sie klar wurde. Nun wurde mit der Zugabe von 350 µl Puffer E3 bakterielle, genomische DNA und Zelltrümmer präzipitiert. Das sich bildende weiße Präzipitat wurde nun bei 14000 rpm für 20 min abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde anschließend in ein neues 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und Plasmid DNA wurde durch Zugabe von 750 µl Isopropanol gefällt. Nach 15 min Zentrifugation bei 14000 rpm wurde das erhaltene DNA Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen, erneut 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert, 5 min bei RT getrocknet und in 50 µl TE Puffer resuspendiert. Die Zusammensetzung der benötigten Puffer sind im Abschnitt B.1.9.2 aufgeführt.

B.2.3.2 Minipräparation von BAC DNA

Das Protokoll zur Gewinnung von großen Low-Copy Plasmiden, wie BACs (Bacterial Artificial Chromosomes; 100-200 kb), erfolgte ähnlich dem Minipräparationsprotokoll der Plasmid DNA. Der Unterschied bestand darin, dass zum einen nur 2 ml Übernachtskultur pro 2 ml Mikroreaktionsgefäß eingesetzt wurden und zum anderen das Pelletieren der bakteriellen, chromosomalen DNA und der Zelltrümmer in zwei Zentrifugationsschritten (14000 rpm) zu je 15 min stattgefunden hat, um Verunreinigungen der BAC DNA zu vermindern.

B.2.3.3 Maxipräparation von Plasmid DNA

Für die Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA, wurde das Maxipräp-Kit NucleoBond® PC100 der Firma Macherey-Nagel verwendet (Kat. Nr. 740573). Es basiert ebenfalls auf dem Prinzip der alkalischen Lyse, jedoch wird die frei werdende Plasmid DNA durch weitere Schritte mittels eines Anionenaustauscherharzes säulenchromatographisch aufgereinigt.

100 ml DYT Medium wurde mit einem Antibiotikum, dessen Resistenz von dem Plasmid codiert wurde, versetzt, mit einer Spatelspitze plasmidtragender Bakterien beimpft und über Nacht kultiviert. Die Zellen wurden anschließend in einem 50 ml Falcon Röhrchen abzentrifugiert (11000 rpm, 1 min, Eppendorf Zentrifuge 5804R, Rotor F-34-638) und das Pellet in 10 ml Puffer S1 resuspendiert. Lyse der Zellen fand nach Zusatz von 10 ml Puffer S2 statt. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei RT wurde bakterielle chromosomale DNA und Zelltrümmer durch Zugabe von 10 ml Puffer S3 und einer weiteren 5 minütigen Inkubation auf Eis präzipitiert. Durch anschließende Zentrifugation (11000rpm, 30 min, Eppendorf Zentrifuge 5804R, Rotor F-34-638) konnte der klare Überstand auf eine mit 6 ml Puffer N2 äquilibrierte AX100 Säule gegeben werden. Nachdem die Säule zweimal mit Puffer N3 gewaschen wurde, konnte die Plasmid DNA mit 15 ml Puffer N5 eluiert werden. Anschließend wurde die DNA mit dem 0,7fachen Volumen Isopropanol gefällt und abzentrifugiert (11000rpm, 20 min, Eppendorf Zentrifuge 5804R, Rotor F-34-638). Das erhaltende Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut für 5 min bei 11000 rpm zentrifugiert. Nun wurde das Pellet bei RT für 10 min getrocknet und in 100 µl TE Puffer gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte wie im Kapitel B.2.2.5 beschrieben. Um die Plasmid-DNA im Agarose Gel zu kontrollieren, wurde ein Restriktionsverdau (siehe B.2.3.1) mit bekannten Schnittstellen und Fragmentgrößen durchgeführt.

B.2.3.4 Maxipräparation endotoxin-freier Plasmid DNA

Zur *in vivo* Transfektion von Plasmid DNA mittels *in utero* Elektroporationstechniken wurde hochreine, von bakteriellen Endotoxinen befreite, DNA eingesetzt. Dabei wurde das Maxipräparationskit der Firma Qiagen angewendet (Kat. Nr. 12362).

Das Prinzip dieser Präparation ähnelt der bereits beschriebenen Methode unter B.2.3.3, jedoch wurde nach dem Pelletieren der bakteriellen chromosomalen DNA und der Zelltrümmer der Überstand in einem 50 ml Falcon Röhrchen mit einem 2,5 ml „Endotoxin-removal“ Puffer versetzt, 10 mal über Kopf geschwenkt und für 30 min auf Eis inkubiert. Alle folgenden Schritte fanden unter Verwendung von endotoxinfreien Puffern statt. Nach der Inkubation auf Eis wurde die Lösung über eine mit 10 ml QBT Puffer äquilibrierten Qiagen-Tip 500 Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule zweimal mit 30 ml QC Puffer gewaschen und die DNA mit 15 ml QN Puffer in ein 50 ml Falcon Röhrchen eluiert. Die Präzipitation der DNA und das Lösen in endotoxinfreien TE Puffer erfolgte wie unter B.2.3.3 beschrieben.

B.2.3.5 Isolierung von mRNA und Herstellung von cDNA

Für die Analyse der Transkription der PRG-1 mRNA per Northern Blot oder für die Synthese von cDNA wurde mRNA mittels des µMACS™ mRNA Isolation Kits der Firma Miltenyi

Biotec (Kat. Nr. 751-01) aus Gehirnen extrahiert. Die Isolierung erfolgt durch Hybridisierung der Poly-A mRNA mit magnetischen Oligo(dT) MircoBeads™. Innerhalb eines magnetischen Feldes können somit mRNA-Oligo(dT) Komplexe von nicht markierten Molekülen wie DNA und Proteinen getrennt werden.

Ca. 250 mg Gehirn einer Maus wurde in 5 ml Lysis/Binding Puffer für 10 s mittels eines Homogenisators (Ultra-TURRAX®, T25 basic, IKA-Werke) auf Eis homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend 4-mal durch eine 21G Spritze gedrückt, um die Viskosität durch Scherung der DNA zu verringern. Daraufhin wurde das Homogenat zum weiteren Aufreinigen für 10 min bei 6000 g durch eine LysatClear Säule zentrifugiert. Ein M-MACS Säule wurde währenddessen in einen magnetischen MACS Separator platziert und mit 250 µl Lysis/Binding Puffer äquilibriert. Das Eluat der Zentrifugation wurde nun mit 250 µl Oligo(dT) MicroBeads™ versetzt, kurz gevortext und auf die äquilibrierte Säule pipettiert. Nach dem Durchfluss des Eluats wurde 3-mal mit 250 µl Lysis/Binding Puffer und 4-mal mit 250 µl Waschpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution der mRNA in ein RNase freies Mikroreaktionsgefäß durch Zugabe von 200 µl, 70 °C vorgewärmten Elutionspuffer.

Für die Umschreibung von mRNA in cDNA wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit der Firma Applied Biosystem verwendet. Das Prinzip des Kits beruht auf dem Einsatz der RNA-anhängigen DNA Polymerase, der Reversen Transcriptase, die RNA Moleküle in DNA umschreiben kann.

Für einen 50 µl Reaktionsansatz wurden 5 µl 10x RT Puffer, 2 µl dNTPs (2,5 mM), 5 µl 10x Random Primer, 2,5 µl MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50U/µl) und 500 ng RNA in ein Mikroreaktionsgefäß auf Eis pipettiert und auf 50 µl mit Wasser aufgefüllt. Der Ansatz wurde anschließend für 10 min bei 25 °C inkubiert, gefolgt von einer zweistündigen Inkubation bei 37 °C. Die fertige cDNA wurde vor der PCR 1 zu 5 verdünnt.

B.2.3.6 Isolierung von genomischer DNA

DNA aus Mausgeweben und embryonalen Stammzellen wurde für die Durchführung von Genotypisierungen, Screenings und Southern Blots verwendet.

B.2.3.6.1 Genomische DNA für PCR

Genomische DNA wurde aus Mausschwanzbiopsien für die Genotypisierung der transgenen Mäuse isoliert. Dazu kam das Invisorb® Spin Tissue Mini Kit der Firma Invitex zum Einsatz. Das Prinzip beruht auf dem Verdau des Mausgewebes mittels Proteinase K und der anschließenden säulenchromatographischen Aufreinigung der freigesetzten DNA.

Ca. 20-50 mg Mäuseschwanzgewebe wurde in einem Mikroreaktionsgefäß mit 400 µl Lysepuffer und 40 µl Proteinase K (Invitex-Kit) für 2-3 Stunden bei 52 °C im Wasserbad

inkubiert. Anschließend wurden unverdaute Gewebereste 1 min bei 14000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Dieser wurde mit 200 µl Binding Puffer versetzt, auf eine SpinFilter Säule pipettiert und für 1 min bei 11000 rpm zentrifugiert: Durch die angesetzte Zentrifugalkraft wurde der Überstand durch die Säule gedrückt. Genomische DNA wurde am Anionenaustauscher-Harz der Säule zurückgehalten. Durch das Pipettieren mit 550 µl Waschpuffer auf die Säule, gefolgt von zwei weiteren Zentrifugationsschritten von jeweils einer bzw. zwei Minuten bei 11000 rpm, wurde die DNA von Proteinen und RNA Molekülen weiter gereinigt. Anschließend wurde sie durch die Zugabe von 50 µl 70 °C heißen Elutionspuffer auf die Säule und einminütige Zentrifugation bei 11000 rpm in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß eluiert. 1 µl der aufgereinigten DNA wurde für die anschließende Genotypisierungs-PCR verwendet.

B.2.3.6.2 Genomische DNA für Southern Blots

Mausgewebe. Zur Verifizierung der KO Mäuse wurde genomische DNA aus größeren Leberproben der Mäuse für Southern Blot Analysen isoliert. Dabei wurden 100 mg Lebergewebe in einem 15 ml Falcon Röhrchen mit 2,5 ml 0,5% SDS Extraktionspuffer gemischt und mittels eines Homogenisators (Ultra-TURRAX®, T25 basic, IKA-Werke) homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat mit 100 µl Proteinase K Lösung versetzt und über Nacht bei 55 °C im Wasserbad inkubiert. RNA wurde am folgenden Tag durch Zugabe von 100 µl RNase A Lösung (1h, 37 °C) verdaut. Anschließend wurde die DNA durch einer Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe B.2.2.3) gereinigt, mit Natriumacetat und Ethanol präzipitiert (siehe B.2.2.4) und in 100 µl TE Puffer resuspendiert und die DNA Konzentration bestimmt (siehe B.2.2.5). Die Zusammensetzung der benötigten Puffer sind im Kapitel B.1.9.3 aufgeführt.

Embryonale Stamm (ES)-zellen. ES Zell DNA wurde zum Screening der homolog rekombinierten Stammzellen auf 96 Well Platten per PCR und Southern Blot Analyse durch die Arbeitsgruppen der Universität Würzburg (AG Sendtner, Dr. Stephan Wiese, PRG-1 KO) und des MDC-Berlin (AG Birchmeier, Dr. Elvira Rohde, PRG-1 cKO) bereitgestellt. Von positiv rekombinierten Stammzellklonen wurden 500 µl ES Zell Lysat pro Klon von den jeweiligen Gruppen zur weiteren Verifizierung per Southern Blot Analyse hergestellt (Proteinase K behandelte ES Zellen; 3 Wells pro Klon einer 6 Well Zellkulturplatte). Das Lysat wurde einer Phenol Chloroform Extraktion unterzogen (siehe B.2.2.3), die gereinigte Stammzell DNA durch eine Natriumacetat Fällung präzipitiert (siehe B.2.2.4) und in 100 µl TE Puffer resuspendiert und die DNA Konzentration ermittelt (siehe B.2.2.5).

B.2.4 Klonierung von DNA Fragmenten

B.2.4.1 Bereitstellung der Ausgangs DNA Fragmente

Für das Einfügen eines DNA Fragments (Insert) in ein Plasmid (Vektor) war es nötig, dass Vektor und Insert komplementäre 5' bzw. 3' Enden („Sticky“) oder glatte Enden (blunt) besaßen. Durch den Verdau des Vektors bzw. des Inserts mit den gleichen Restriktionsenzymen (siehe B.2.2.9), dem anschließenden Gellauf in einem Agarose Gel (siehe B.2.2.1) und der Isolierung der verdauten DNA aus dem Agarosegel (siehe B.2.2.2), wurden die Ausgangs-DNA Fragmente für die Klonierung bereitgestellt. Die Quantifizierung der Menge der DNA Fragmente erfolgte durch einen erneuten Gellauf mit 1/10 Volumen der aufgereinigten DNA und der Abschätzung anhand des Größenmarkers (siehe B.2.2.1).

B.2.4.2 Auffüllen der überhängenden Enden zu glatten Enden

Wenn keine gleichen oder geeigneten Restriktionsschnittstellen gefunden werden konnten, wurden überhängende („sticky“) Enden mittels der T4-DNA Polymerase (siehe B.1.2) zu glatten Enden (blunt) mit dNTPs aufgefüllt. Dazu wurde vor der Gelelektrophorese die verdauten DNA (50 µl) mit 1 µl T4-DNA Polymerase und 1 µl dNTP-Mix (2,5mM pro NTP) gemischt und für 20 min bei 12 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der Polymerase bei 70 °C für 20 min und die Auftrennung in einem Agarosegel (siehe B.2.2.1) mit anschließender Isolation (siehe B.2.2.2).

B.2.4.3 Dephosphorylierung von DNA Fragmenten

Um die Selbstligation des Vektors während der Ligation zu verhindern, wurden die 5' Enden der Vektor DNA nach der Gel-Aufreinigung durch die hitzeinaktivierbare Shrimps Alkalische Phosphatase (siehe B.1.2) dephosphoryliert.

10 µl Vektor DNA (200-400 ng) wurden mit 1 µl SAP 10x Puffer und 1 µl SAP gemischt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der Phosphatase durch Inkubation bei 65 °C für 15 min.

B.2.4.4 Ligation von DNA Fragmenten

Für die Ligation der vorbereiteten DNA Fragmente wurde die T4-DNA Ligase (siehe B.1.2) verwendet. Dazu wurden 6 µl des dephosphorylierten Vektors (100-200 ng) mit 10 µl Insert (10-100 ng), 2 µl 10x Ligase Puffer (NEB) und 2 µl T4-DNA Ligase (siehe B.1.2) gemischt und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Hitzetransformation von *E. coli* Zellen mit dem Ligationsansatz (20µl) (siehe B.2.2.7.1). Die Ligation wurde verifiziert durch die Präparation (B.2.3.1) und Restriktion (B.2.2.9) der Plasmid DNA einzelner Klone.

B.2.5 Rekombination von DNA Fragmenten in Bakterienzellen

B.2.5.1 Homologe Rekombination über Red-Gene

Für die Herstellung des Zielvektors pPRG1cKO der konditionellen Knockout Maus wurden Bakterien eingesetzt, die die sequenzspezifische Integration oder Entfernung von DNA-Fragmenten durch homologe Rekombination in bzw. aus Plasmiden oder BACs ermöglichen [102]. Die dazu notwendigen homologen DNA Fragmente besaßen eine Länge von 300-500 bp und wurden aus BACs, die genomische DNA enthielten, amplifiziert. Für die Rekombination wurden *E. coli* DY380 Zellen eingesetzt, da diese die für die Rekombination benötigten Proteine unter der Kontrolle eines temperatursensitiven Repressors exprimieren konnten. Durch die Induktion der Expression dieser Proteine (*Red* Gene *exo*, *bet*, *gam* des Bakteriophagen Lambda) wird die homologe Rekombination der eingebrachten doppelsträngiger DNA Fragmente mit bereits vorhandener homologer Plasmid-DNA, BAC-DNA oder chromosomalen DNA vermittelt [102]. Das Prinzip der Rekombination ist in Abbildung 6 dargestellt.

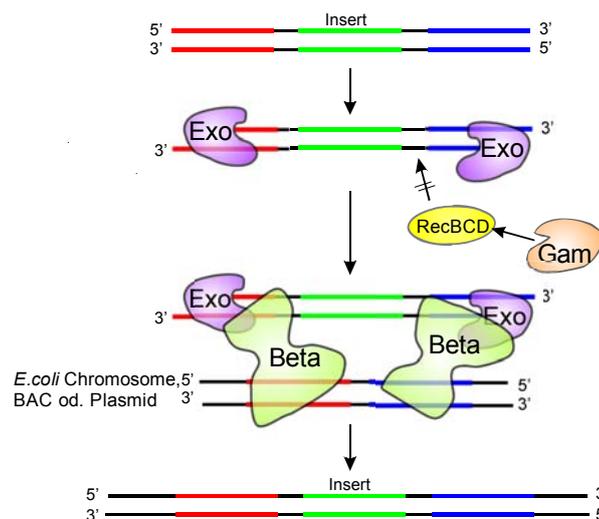


Abbildung 6. Prinzip der Insertion von DNA Fragmenten durch *Red*-Gene vermittelte homologe Rekombination in *E. coli* DY380. Durch die Induktion der Expression der Red-Proteine Exo, Beta und Gam wird die sequenzspezifische homologe Rekombination vermittelt. Die Lambda 5'→3' Exonuclease Exo degradiert 5' überhängende Enden und produziert dadurch 3' Einzelstränge, die von dem „Pairing“ Protein Beta erkannt werden und einen Komplex mit Exo bildet, welche das Finden (Annealing) der homologen DNA und die Rekombination fördert. Das Protein Gam verhindert den Abbau der 3' überhängenden Enden durch die bakteriellen RecBCD Exonucleasen.

Zunächst wurde der zu modifizierende Vektor durch Transformation in DY380 Zellen eingebracht. Eine 100 ml DYT Lösung wurde mit transformierten Zellen beimpft und bis zu

einer OD_{550} von 0,6-08 bei 32 °C inkubiert. Daraufhin wurde die Expression der Red-Gene durch eine 15minütige Inkubation der DYT Zellsuspension bei 42 °C induziert. Anschließend wurden die Zellen für eine Elektrotransformation vorbereitet (siehe B.2.2.6.2) und das homologe DNA Fragment in die nun rekombinationskompetenten Zellen elektroporiert (siehe B.2.2.7.2). Rekombinierte Zellklone wurden auf Agarplatten bei 32 °C mit entsprechender Antibiotika Resistenz selektioniert. Die korrekte Rekombination wurde durch einen Restriktionsverdau der Plasmid DNA überprüft (siehe B.2.2.9).

B.2.5.2 Sequenzspezifische Rekombination über Cre und FLP Rekombinasen

E.coli EL-Stämme wurden zum Einfügen einzelner LoxP Sequenzen und zum Test der in dem Zielvektor pPRG1cKO eingefügten LoxP bzw. FRT Sequenzen verwendet. Sie besitzen ein in ihr Genom integrierte Expressionskassette für die Cre- bzw. FLP-Rekombinase, die durch einen Arabinose induzierbaren pBAD Promoter kontrolliert wurden (Cre bei *E. coli* EL350 bzw. FLP bei *E. coli* EL250; siehe B.1.3).

100 ml DYT wurden mit 1 ml einer Übernachtskultur des Bakterienstammes beimpft und bei 32 °C bis zu einer OD_{550} von 0,5 inkubiert. Anschließend wurde 1 ml 10%ige Arabinose (in H_2O) in die Bakteriensuspension pipettiert, um die Expression der Rekombinase (Cre bzw. FLP) zu induzieren. Nach einer einstündigen Inkubation bei 32 °C wurden die Zellen für eine Elektrotransformation vorbereitet (siehe B.2.2.6.2) und mit dem zu rekombinierenden Plasmid elektroporiert (siehe B.2.2.7.2). Korrekte Rekombination wurde durch Minipräparation der Plasmid DNA (siehe B.2.3.1) und Restriktionsverdau überprüft (siehe B.2.2.9).

B.2.6 Embryonale Stammzellkultur und Blastocysteninjektion

Die Elektroporation von embryonalen Stammzellen (ES) mit den Zielvektoren und die Selektion auf homolog rekombinierte ES-Zellen, sowie die anschließende Injektion positiv getesteter ES Zellen in Blastozysten zur Generierung chimärer Mäuse, wurde für die verschiedenen Mauslinien durch Kooperationspartner durchgeführt. Für die Generierung der konstitutiven KO Maus geschah dies in der Arbeitsgruppe von Prof. Michael Sendtner, Universität Würzburg. Die Arbeiten zur Generierung der konditionelle KO Maus wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Carmen Birchmeier und der Transgenen „Core Facility“ des Max-Delbrück-Centrums für Molekulare Medizin, Berlin Buch im Rahmen des DFG Sonderforschungsbereichs SFB-665 C1 durchgeführt.

B.2.7 Nachweis der Rekombination per Southern Blot Analyse

Um embryonale Stammzellen auf homologe Rekombination mit dem Zielvektor zu untersuchen und um die fertigen Knockout Mäuse zu verifizieren, wurden Southern Blots durchgeführt. Dazu wurde genomische DNA durch Restriktionsenzyme verdaut und im Agarosegel nach Fragmentgrößen aufgetrennt. Anschließend erfolgte der Transfer der verdauten DNA auf eine Nylon Membran („Southern Blot“) und die Hybridisierung einer radioaktiv markierten Sonde zur Detektion von DNA Fragmenten, die aufgrund der homologen Rekombination in ihrer Größe gegenüber dem Wildtyp Muster verändert waren. Durch die Exposition eines Röntgenfilms mit der hybridisierten Nylonmembran und der anschließenden Entwicklung konnten Veränderungen im Genom nachgewiesen werden.

B.2.7.1 Restriktionsverdau, Agarosegellauf und Southern Blot

Zunächst wurden 8-12 µg genomische DNA über Nacht mit ca. 10-20 U Restriktionsenzym (NEB) verdaut (siehe B.2.2.9). Der komplette Restriktionsansatz wurde anschließend in einem 0,6%igem Agarose Gel bei 50-60 V für ca. 16 h elektrophoretisch aufgetrennt.

Die DNA Fragmente wurden danach durch eine 15minütige Inkubation des Agarosegeles in Depurinisierungspuffer partiell depurinisiert. Nach einem kurzen Ausspülen des Puffers mit Wasser (30 s), erfolgte eine 45minütige Inkubation in Denaturierungspuffer und anschließend einer 45minütigen Inkubation in Neutralisierungspuffer. Das so behandelte Agarose Gel wurde nun weitere 10 min in 20x SSC Puffer inkubiert. Die einzelnen Pufferzusammensetzungen sind unter B.1.9.4 aufgeführt.

Die Nylon Membran (Hybond™-N, Amersham Biosciences, Kat. Nr. RPN303N) wurde für 5 min in 10x SSC Puffer inkubiert und anschließend zusammen mit dem Agarose Gel wie in Abbildung 7 zu einem Southern Blot zusammengesetzt. Dabei erfolgte der DNA-Kapillartransfer auf die Nylonmembran in 20x SSC Puffer. Abschließend wurde die DNA in einem Cross-linker (BioRAD) kovalent auf die Membran gebunden.

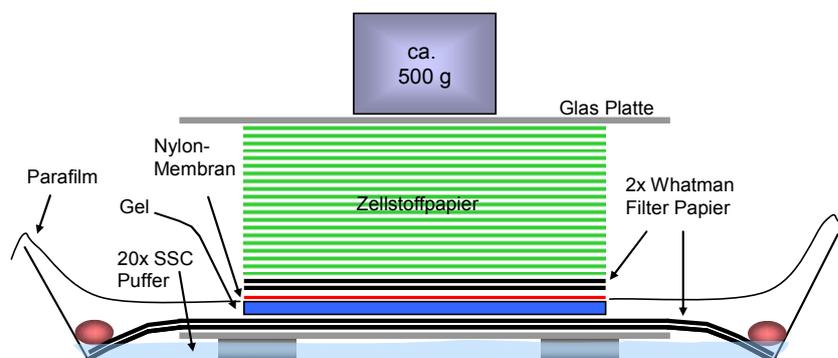


Abbildung 7. Aufbau eines Southern Blots. Durch Kapillarkräfte wurden DNA Fragmente aus dem Agarose Gel auf eine Nylon Membran in 20x SSC über Nacht transferiert.

B.2.7.2 Herstellung radioaktiv markierter DNA Sonden

Zur Herstellung radioaktiv markierter Sonden, wurde das Prime-a-Gene[®] Labeling Kit der Firma Promega eingesetzt. Hexadesoxyribonukleotide, die eine zufällige Sequenz besaßen und sich daher zufällig an komplementäre einzelsträngige DNA anlagern konnten, wurden als Primer für das große Fragment der E.coli DNA Polymerase I (Klenow Fragment) benutzt. Das Klenow Fragment konnte mit seiner 5'→3' Polymeraseaktivität ausgehend von freien 3'OH Enden der Oligonukleotide einen neuen komplementären Gegenstrang synthetisieren und dabei radioaktiv markiertes alphaP³²-dCTP einbauen [105].

25 ng DNA-Fragment (in der Regel 300-900 bp) wurden mit H₂O zu einem Endvolumen von 30 µl vermischt und im Wasserbad bei 95 °C für 2 min denaturiert. Anschließend wurde die DNA sofort auf Eis gekühlt und mit 14 µl Markierungspuffer (10 µl Klenowpuffer (mit Primern), 2 µl BSA, 2 µl dATP/dGTP/dTTP-Mix (jedes 500 µM)), 5 µl alphaP³²-dCTP (50 µCi) und 1 µl Klenow-Fragment (5 U) versetzt. Nach einer Stunde Inkubation bei RT wurde das Klenow-Fragment durch Inkubation bei 95 °C zerstört und die markierte DNA wurde durch das Gelaufreinigungskit NucleoSpin Extract II (Machery&Nagel) von restlichen Primern und Nukleotiden gereinigt (siehe B.2.2.2) und mit 200 µl TE Puffer in ein Mikroreaktionsgefäß eluiert.

B.2.7.3 Radioaktive Hybridisierung und Autoradiographie

Zur Hybridisierung der radioaktiv markierten DNA mit der auf die Nylonmembran geblotteten DNA wurde zunächst die Nylonmembran in einem Hybridisierungsröhrchen für 30 min in 5-10 ml Hybridisierungspuffer [106] (siehe B.1.9.4) vorhybridisiert. Anschließend wurde die radioaktiv markierte 200 µl DNA-Lösung im kochenden Wasserbad für 2 min denaturiert und mit 5-10 ml 68 °C vorgewärmten Hybridisierungspuffer vermischt und in das Hybridisierungsröhrchen mit der vorhybridisierten Nylonmembran gegeben. Die Hybridisierung erfolgte nun über Nacht für mindestens 16 h bei 68 °C. Nach der Hybridisierung erfolgte das Waschen der Nylonmembran. Dabei wurde zunächst die Membran mit Waschpuffer 1 (siehe B.1.9.4) für 5 min bei RT gespült, gefolgt von 3 Waschschritten für 10 min bei 50 °C, 55 °C und 60 °C. Anschließend wurde die Membran für 5 min in dem stringenteren Waschpuffer 2 (siehe B.1.9.4) bei 65 °C gewaschen und die Radioaktivität mit dem Handmonitor gemessen. Lag sie nur unwesentlich über dem Hintergrund, wurde die Waschung beendet, andernfalls wurde erneut für 2-5 min mit Waschpuffer 2 bei 65 – 70 °C gewaschen.

Die gewaschene Membran wurde in eine Folie verpackt, in eine Röntgenkassette (mit Verstärkerfolie) überführt und mit einem Röntgenfilm (Kodak Biomax MR) bei -80 °C für einen Tag bis zu einem Monat exponiert. Anschließend wurde der Röntgenfilm entwickelt.

B.2.8 Nachweis von mRNA per Northern Blot

Northern Blots wurden durchgeführt, um Transkripte durch Hybridisierung mit radioaktiv markierter DNA auf Nylonmembranen nachzuweisen.

B.2.8.1 Probenvorbereitung

Zunächst wurde mRNA aus Gehirnhomogenaten isoliert (siehe B.2.3.5) und deren Konzentration bestimmt (siehe B.2.2.5). 2,5 µg RNA wurden anschließend durch eine Ethanol-Natriumacetat Fällung präzipitiert (siehe B.2.2.4) und in 10 µl H₂O gelöst. Danach wurde die gelöste RNA mit 20 µl 1,5x Ladepuffer (siehe B.1.9.4) vermischt und für 15 min bei 55 °C inkubiert.

B.2.8.2 Gellauf, Transfer, Hybridisierung und Autoradiographie

Zur elektrophoretischen Auftrennung der mRNA wurde ein formaldehydhaltiges Agarose Gel präpariert. Dazu wurde 1 g Agarose in 72 ml H₂O gelöst und auf 60 °C im Wasserbad temperiert. Anschließend wurden 10 ml 60 °C 10x MOPS Laufpuffer (siehe B.1.9.4) und 18 ml 12,3 M Formaldehyd dazugemischt, und die Lösung in einen Gelträger gegossen. Nachdem die Agarose fest geworden war, wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer überführt, die mit einer ausreichender Menge 1x MOPS Laufpuffer befüllt wurde. Die mRNA-Lösung wurde mit 3µl 10x Ladepuffer (enthält Bromphenolblau, siehe B.1.9.1) angefärbt und in die Taschen des Geles pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte für 3-4 h bei 70-80 V.

Mit Ausnahme der fehlenden Depurinisierung erfolgte der Transfer der RNA auf die Nylonmembran nach dem gleichen Protokoll wie bereits für den DNA Transfer beschrieben (siehe B.2.7.1).

Die Herstellung der radioaktiv markierten DNA-Sonde wurde ebenfalls wie unter B.2.7.2 beschrieben durchgeführt. Die Hybridisierung der Sonde mit der Membran erfolgte bei 65 °C über Nacht. Die Waschschriffe und die Autoradiographie erfolgten nach den gleichen Protokollen wie bereits für die Southern Blot Analyse beschrieben (siehe B.2.7.3)

B.2.9 Analyse der Proteinexpression per Western Blot

Um die Expression von Proteinen zu quantifizieren, wurden Western Blots durchgeführt. Dazu wurden Proteine aus Mausgewebe isoliert, die Gesamtmenge quantifiziert und anschließend elektrophoretisch in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrer Größe aufgetrennt. Durch den nachfolgenden Blot der Proteine aus dem Gel auf eine Zellulosemembran und die darauf anschließende immunologische Nachweisreaktion konnte spezifische Proteinexpression analysiert werden.

B.2.9.1 Isolierung von Membranproteinen aus Mausgewebe

Das Gehirn einer Maus wurde je nach Größe mit 1-3 ml Proteinisolierungspuffer in einem 15 ml Falcon Röhrchen mittels eines Homogenisators (Ultra-TURRAX[®], T25 basic, IKA-Werke) auf Eis homogenisiert. Anschließend wurden Membranproteine durch eine Ultraschallbehandlung (3x 1 s Impuls, Bandelin electronic, UW70) weiter vereinzelt und die Suspension wurde für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Durch die nachfolgende Zentrifugation für 10 min bei 14000 rpm bei 4 °C wurden nicht aufgelöste Gewebebestandteile pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und bei -80 °C eingefroren.

B.2.9.2 Isolierung von Synaptosomen

Um die spezifische Expression von Proteinen an der synaptischen Membran per Western Blot Analyse zu untersuchen, wurden Synaptosomen, d.h. Membranen der Prä- und Postsynapse mit ihren Proteinen, präpariert. Dazu wurden Gehirne in Homogenisierungspuffer (siehe B.1.9.5) aufgenommen (5 ml/g Gewebe) und mit einem Wheton-Homogenisator (Heidolph RZR 2021) zehnmal bei 900 rpm homogenisiert. Das erhaltende Homogenat (H) wurde anschließend bei 1400xg für 10 min zentrifugiert, um Zellkerne und größere Membranbestandteile zu pelletieren (P1). Der Überstand (S1) wurde anschließend bei 14000xg für 15 min zentrifugiert. Das Pellet (P2) enthielt die Synaptosomen und wurde in Homogenisierungspuffer resuspendiert. Anschließend wurde der Gehalt an Proteinen jeder einzelnen Fraktion bestimmt (siehe B.2.9.3).

B.2.9.3 Quantifizierung von Proteinkonzentrationen

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration von Lösungen wurde das Pierce[®] BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Kat. Nr. 23225) verwendet. Das Prinzip beruht auf der Eigenschaft der Proteine, zweiwertige Kupferionen in alkalischer Umgebung zu einwertigen Ionen zu reduzieren. Durch die Chelatbildung von zwei Molekülen Bicinchoninsäure (*engl.* bicinchoninic acid, BCA; 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure) mit einem einwertigen Kupferion entsteht ein violette wasserlösliches Produkt, welches photometrisch gemessen werden kann [107].

25 µl Proteinlösung (1:10 - 1:1000 verdünnt) wurden mit 200 µl Arbeitsreagenz (50 Teile Lösung A und 1 Teil Lösung B) in einer Mikrotiterplatte vermischt, 30 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und anschließend photometrisch bei einer Absorption von 562nm gemessen. Durch den Vergleich mit einem BSA Standard (50 - 800 µg/ml) wurde die Proteinkonzentration ermittelt.

B.2.9.4 Elektrophoretische Auftrennung (SDS-PAGE)

Durch das im SDS-PAGE Probenpuffer (siehe B.1.9.5) enthaltene SDS werden alle Proteine mit einer gleichmäßig verteilten negativen Ladung abgesättigt (SDS mit negativen SO_4^{2-} Gruppen). Die Laufgeschwindigkeit in einem Elektrophorese Gel ist somit nur noch von der Größe und nicht mehr von der unterschiedlichen Ladung der Proteine abhängig.

Als diskontinuierliche SDS-PAGE wurden ein 10 %iges Trenngel (pH 8,8) und darauf ein Sammelgel (pH 6,8) in einer Gelpräparationskammer (BioRAD) gegossen (Zusammensetzung der Gele siehe B.1.9.5). Daraufhin wurde das auspolymerisierte Gelsystem in eine mit 1x SDS-PAGE Laufpuffer befüllten Elektrophoresekammer (BioRAD) überführt. Die Proteinprobe wurde währenddessen mit 3x SDS-PAGE Probenpuffer (12 μl Protein, 6 μl 3xPuffer) und 2 μl 20% (v/v)-iges β -Mecaptoethanol versetzt und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht, um Tertiärstrukturen und Disulfidbrücken zu zerstören. Anschließend wurde die Probe auf das Gel aufgetragen und die Elektrophorese bei 80 V gestartet. Durch den pH Wert des Sammelgeles (pH 6,8) kommt es zu einer Konzentrierung der Proteine an der Front zum Trenngel und damit zu einer besseren Auflösung der Auftrennung der Proteine im Trenngel. Bei Erreichen des Trenngeles wurde die angelegte Spannung auf 120 V erhöht. Nach 1-2 Stunden wurde die Elektrophorese beendet.

B.2.9.5 Transfer der Proteine (Western Blot)

Der Transfer der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf die proteinbindende Nitrozellulose Membran erfolgte elektrophoretisch mittels eines Semi-dry Transfer Verfahrens. Dazu wurde die Nitrozellulosemembran (Protran, Whatman GmbH, Kat. Nr. BA85) und zwei Blotfilterpapiere (BioRad, Kat. Nr. 1703965) in Semi-dry Transfer Puffer (siehe B.1.9.5) kurz inkubiert und sandwichartig auf die Anodenplatte der Elektrophoresekammer (PeqLab Biotechnologie GmbH) aufgebaut: 1. Blotpapier, 2. Membran, 3. Gel, 4. Blotpapier. Nach der Entfernung von Luftblasen und überschüssigem Puffer wurde die Kathodenplatte auf die Anordnung gelegt und die Übertragung der Proteine bei 16 V für 50 min durchgeführt. Zur Kontrolle des Transfers wurden die Proteine auf der Membran durch Inkubation in 1x Ponceau Lösung (siehe B.1.9.5) für 2-3 min angefärbt. Anschließend wurde die Membran durch kurzes Spülen in H_2O wieder entfärbt.

B.2.9.6 Immundetektion der transferierten Proteine

Um unspezifisches Binden der für die Detektion verwendeten Antikörper zu verhindern, wurde die Membran zunächst in 10 % (w/v) Magermilch (in PBS) für eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem jeweiligen primären Antikörper in der für diesen Antikörper spezifischen Verdünnung in PBS (siehe Tabelle 7) über Nacht bei 4 °C

inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal 10 min in PBS gespült und mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (siehe Tabelle 7) für 2-3 h bei RT in PBS inkubiert. Anschließend wurde erneut dreimal 10 min in PBS gespült und die Bindung des Sekundärantikörpers mittels des ECL™ Western Blotting Detektionssystems (Amersham, Kat Nr. RPN2109) nachgewiesen. Dazu wurde die Membran mit einer 1:1 Mischung aus ECL-Reagenz 1 und 2 für ca. 1 min inkubiert. Die dabei entstehende Chemilumineszenz, verursacht durch die Peroxidase des Sekundärantikörpers, wurde durch Auflegen und Entwickeln eines Röntgen Films (Amersham, Hyperfilm, Kat Nr. 28-9068-36) detektiert. In einigen Fällen wurde anschließend die Quantifizierung der Expression von Proteinen mittels der Software LabImage 1D 2006 durch Vergleich mit den Bandenintensitäten eines Standardprotein (z.B. β -Actin oder Synaptophysin) durchgeführt.

B.2.10 Zellkulturarbeiten

B.2.10.1 Präparation von primären Neuronen

Primäre hippocampale Neurone wurden nach den bereits beschriebenen Protokollen von Brandt et al. 2007 [108] durchgeführt. Dazu wurden trächtige E17 Mäuse durch zerebrale Dislokation getötet, der Bauch durch 70 % igen EtOH desinfiziert und geöffnet. Die Embryos wurden entnommen und in eine eisgekühlte Petrischale überführt. Das Gehirn der Embryos wurde anschließend in HBSS Medium (Gibco, Kat. Nr. 14170-138) herauspräpariert, die Meningen entfernt und die Hippocampi in HBSS Medium überführt. Diese wurden anschließend zweimal mit 5 ml HBSS gewaschen und in 1 ml HBSS und 50 μ l Trypsin (2,5 % (Gibco, Kat. Nr. 15090-046) für 15-20 min bei 37 °C inkubiert. Die Hippocampi wurden nun in 1 ml Plating Medium (siehe B.1.9.7) überführt und mit einer autoklavierten, polierten Glaspasteurpipette (VWR international, Kat. Nr. 612-1799) mehrmals vorsichtig auf und abgesogen (max. 10 mal) (triturieren), um die Neurone aus ihren Zellverband zu lösen. Anschließend wurde der Überstand in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und die Zellen gezählt. 150000 Zellen pro Well wurden in eine, mit 1 ml Plating Medium pro Well versetzte, 12 Well Platte (Falcon, Kat. Nr. 353043) pipettiert und für 3 h bei 37 °C, 5% CO₂ inkubiert (Inkubator Binder C150). Für mikroskopische Analysen wurde die 12 Well Platte vorher mit einem Glasplättchen (Menzel-Gläser, d20 mm) pro Well bestückt, welches im Well mit Poly-L-Lysin beschichtet wurde (3 h mit 1 ml Poly-L-Lysin (200 μ g/ml) in Boratpuffer (siehe B.1.9.7) und 2-mal mit H₂O waschen). Nach der 3 stündigen Inkubation der Zellen in Plating Medium wurde vorsichtig das Medium entfernt, 2-mal mit PBS gewaschen und 1 ml Wachstumsmedium (siehe B.1.9.7) pro Well pipettiert. Die primären Neurone wurden so eine Wochen bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert.

B.2.10.2 Phospholipid Aufnahmeexperimente an primären Neuronen

Phospholipid Aufnahmeexperimente wurden mit dem fluoreszierenden PA Analogon (1-Hexanoyl-2-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl]-sn-Glycero-3-Phosphat (NBD-PA, Avanti Polar Lipids, Kat Nr. 810177C) an primären Neuronen nach beschriebenen Protokollen durchgeführt [29, 100]. In einem Verhältnis 20 : 5 wurden 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (PC, Avanti Polar Lipids, Kat Nr. 850457C) und NBD-PA in einem 15 ml Falcon Röhrchen gemischt. Das gemeinsame Lösungsmittel Chloroform wurde durch Anlegen eines Vakuums entfernt (Speed Vac). Anschließend wurden die Lipide in 10 ml MEM (Gibco, Kat. Nr. 31095-052) durch eine 3minütige Inkubation im Ultraschallbad in Suspension gebracht (Konzentration der Lipide 10 μ M, Mizellenbildung [29]). Nachdem die auf Glasplättchen gewachsenen primären Neurone (7 D.I.V.) 2-mal mit PBS gewaschen wurden, wurde 1 ml der Lipid-Suspension pro Well pipettiert und 5 Minuten bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit kaltem PBS 2-mal gewaschen, für 20 min mit kaltem 4% PFA (siehe B.1.9.6) fixiert, erneut 1-mal mit PBS gewaschen und mittels des Glasplättchens in Immumount (Thermo Scientific, Kat. Nr. 9990402) auf Objektträger überführt. Die fluoreszierenden Neurone wurden anschließend mit einem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop (Leica SL) analysiert. Die Bilder wurden mit einem 40x Öl-Objektiv und einem internen 4x Zoom in einer Fokusebene mit der höchsten Signalintensität bei gleichbleibenden Eigenschaften der Strahlengangkonfigurationen aufgenommen. Die Aufnahmen wurden anschließend mit der Software ImageJ (Research Service Branch, National Institute of Health, USA, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) ausgewertet.

B.2.11 Histologische Methoden

Um die Expression von Proteinen und morphologische Veränderung innerhalb eines Gewebes zu untersuchen, wurden histologische Methoden an Gehirnschnitten der Knockout und der Wildtypmaus angewendet.

B.2.11.1 Perfusion von Mäusen

Die Perfusion ist ein Verfahren zum Ausspülen des Blutsystems mit einer isotonischen Lösung. Für histologische Zwecke wurde nach der erfolgreichen Perfusion das System mit einem Fixierungsmittel fixiert.

Vor der Perfusion wurde die Maus gewogen und erhielt entsprechend ihres Gewichtes intraperitoneal eine Narkoselösung (siehe B.1.9.6, 0,5-1 ml / 20-25 g). Anschließend wurde die Maus in tiefer Narkose in der Mittellinie mit einer Schere eröffnet. Durch seitliches Einschneiden der Rippen und Hochklappen des Brustkorbes wurde ein freier Zugang zum Herzen erreicht. Anschließend wurde mit einer Kanüle in den linken Ventrikel des Herzens

gestochen, der rechte Vorhof eröffnet und das Tier mit 37 °C warmer Tyrodelösung (siehe B.1.9.6) über die Kanüle perfundiert (1 ml / 30 s; 5-8 min). Nach Entfärbung der Leber wurden weitere 5-8 min mit 4 % PFA Lösung (siehe B.1.9.6) das Gewebe fixiert. Nach der Perfusion wurde das Gehirn herauspräpariert und für weitere 24 h bei 4 °C in 4 % PFA Lösung für anschließende Verarbeitungen nachfixiert.

B.2.11.2 Herstellung von Gewebeschnitten

B.2.11.2.1 *Kryostatschnitte*

Für die Herstellung von Gefrierschnitten mussten die perfundierten und nachfixierten Gehirne in einem 15 ml Falcon Röhrchen in 30 %iger Saccharose Lösung (in PB Puffer, siehe B.1.9.6) überführt werden. Nach dem Absinken der Gehirne innerhalb des Röhrchens wurden sie über flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Aus eingefrorenen Gehirnen wurden anschließend 20 µm dicke Gefrierschnitte an einem Kryostat (Leica CM1900) angefertigt, auf einen Objektträger (Superfrost, R.Langenbrinck, Kat. Nr. 03-0060) überführt und bei -80 °C gelagert.

B.2.11.2.2 *Vibratomschnitte*

Ein perfundiertes und nachfixiertes Gehirn wurde in PB Puffer überführt und in flüssige, handwarme 4 %ige Agaroselösung (in PB) eingebettet. Nach dem Auspolymerisieren der Agarose wurde das Gehirn in einem Agaroseblock ausgeschnitten und mittels eines Vibratoms (Microm HM650V) zu 50 µm dicken Schnitten verarbeitet (60 Hz, $v = 1-1,2$ mm/s). Die Schnitte wurden in PB Puffer überführt und für weitere Anwendungen bei 4 °C gelagert.

B.2.11.3 X-Gal Färbung

Die konstitutionelle Knockout Maus für PRG-1 sollte eine *LacZ* Reporterkassette besitzen, mit der die endogene Expression von PRG-1 leicht nachgewiesen werden kann. Die bakterielle β -Galactosidase, die durch *LacZ* exprimiert wird, kann X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) hydrolytisch in Galactose und 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl spalten. Durch Verwendung von Oxidationsmitteln wird 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl zu einem blauen Indigofarbstoff oxidiert (5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo).

Da eine Überfixierung die Aktivität der β -Galactosidase beeinträchtigen würde, wurden die perfundierten Gehirne nur 2 h in 4 % PFA nachfixiert, und anschließend in PB Puffer überführt und am Vibratom zu 50 µm Schnitten verarbeitet. Die X-Gal Lösung (siehe B.1.9.6) wurde 1:200 in X-Gal Färbepuffer (siehe B.1.9.6) verdünnt und mit den Schnitten für 30 min (bis über Nacht) bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden restliche Spuren von X-Gal durch 3x10 min Waschen in PB-Puffer entfernt. Die Schnitte wurden auf Objektträger

überführt, durch eine Alkoholreihe entwässert (5 min, 70 %; 5 min 80 %, 2x5 min 96 %, 2x5 min Xylol) und in Enthelan (Merk, Kat. Nr. 1.07961.0500) eingedeckelt.

B.2.11.4 TIMM Färbung

Die durch Timm (1958) beschriebene Methode der Silber-Sulfid Färbung ermöglicht die Darstellung des Gehalts an Schwermetall-Ionen in Geweben [109]. Aufgrund des hohen Gehaltes an Zink-Ionen in den präsynaptischen Vesikeln der hippocampalen Moosfasern (Axone der Körnerzellen im Gyrus Dentatus) ließ sich diese Färbemethode auf den Hippocampus übertragen. Dadurch konnten die Terminationsgebiete der Moosfasern in Gehirnschnitten dargestellt und Veränderungen im Moosfasersprouting zwischen Knockout und Wildtyp Mäusen aufgezeigt werden. Das Prinzip beruht erstens auf der Präzipitation von synaptischem Zn^{2+} zu wasserunlöslichem Zinksulfid durch eine sulfidische Lösung und zweites auf der späteren Reduktion von Ag^{3+} zu wasserunlöslichem Silber durch Zinksulfid an den präsynaptischen Vesikeln.

Die Perfusion der Mäuse unterschied sich von der bereits beschriebenen Perfusionsmethode (siehe B.2.11.1) dadurch, dass 5 min mit ca. 20 ml Fixativ I (siehe B.1.9.6), gefolgt von 5 min mit ca. 20 ml Fixativ II (siehe B.1.9.6) und erneut weitere 5 min mit ca. 20 ml Fixativ I perfundiert wurde. Die Gehirne wurden in 4 % PFA über Nacht bei 4 °C nachfixiert und anschließend für Kryostatschnitte vorbereitet. Nachdem ca. 40 µm dicke Gehirnschnitte angefertigt und auf Objektträger (OT) überführt wurden, wurden die OT mit Entwicklerlösung (siehe B.1.9.6) in einer abgedunkelten Küvette bei 28 °C für 30-45 min inkubiert. Anschließend wurden die OT 2x10 min mit Wasser gespült. Das Silber-Präzipitat wurde für 10 min in Natriumthiosulfat Lösung (siehe B.1.9.6) fixiert und die OT erneut für 5 min in H_2O gespült. Die Schnitte wurden durch eine Alkoholreihe entwässert (5 min, 70 %; 5 min 80 %, 2x5 min 96 %, 2x5 min Xylol) und in Enthelan eingedeckelt.

B.2.11.5 Immunhistochemische Färbungen

B.2.11.5.1 In situ Hybridisierung von Gefriergewebeschnitten

Zur Darstellung transkribierter RNA in einem Gewebeschnitt wurde eine Digoxigenin (DIG) – *in situ* Hybridisierung durchgeführt. Dabei bindet DIG markierte RNA mit komplementären transkribierten RNA Molekülen im Gewebe. Durch die Bindung eines mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Anti-DIG FAB Fragments kann die DIG-RNA im Gewebeschnitt durch die Dephosphorylierung einer Färbelösung (BCIP/NBT) nachgewiesen werden, da ein blaues Präzipitat entsteht.

Zur Herstellung der DIG markierten RNA wurde das DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) der Firma Roche (Kat Nr. 11 175 025 910) verwendet. Dazu wurde *in vitro* die DIG-RNA durch

die Transkription von DNA aus einem linearisierten Plasmid (pSPT18/19 siehe B.1.6) über die T7 RNA Polymerase und dem Einsatz von DIG-UTP hergestellt.

1 µg linearisierte und aufgereinigte DNA wurden mit Wasser auf 13 µl in einem RNase freien Mikroreaktionsgefäß verdünnt. Anschließend wurden 2 µl 10x NTP labeling mix, 2 µl 10x Transkriptionspuffer, 1 µl RNase Inhibitor und 2 µl T7 RNA Polymerase dazu pipettiert und vermischt. Der Ansatz wurde für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend für 15 min mit 2 µl DNase I bei 37 °C inkubiert, um die Ausgangs-DNA aus der Reaktion zu entfernen. Die Reaktion wurde dann durch Hinzugabe von 2 µl 0,2 M EDTA (pH 8,0) abgestoppt und das fertige RNA Transkript auf einem Agarose Gel analysiert. Um die Einbaueffizienz von DIG-UTP zu kontrollieren, wurden ein Spotttest durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Verdünnungen der markierten RNA mit bekannten RNA Konzentrationen (Roche) durch immunologische Färbereaktion (Alkalische Phosphatase-DIG-Anti-FAB und BCIP/NBT) auf einer Nylonmembran verglichen und so die Konzentration der markierten RNA bestimmt.

Für die *in situ* Hybridisierung wurden die Gefrierschnitte auf dem OT zunächst für 20 min mit 4 % PFA erneut fixiert. Um polare und geladene Proteingruppen in Gewebeschnitten zu blockieren, wurden die Schnitte nach dem Auswaschen des PFAs (3 mal 5 min in Waschpuffer, siehe B.1.9.6) für 10 min in Acetylierungslösung (siehe B.1.9.6) inkubiert. Nach dem Auswaschen der Lösung (4 mal 5 min in Waschpuffer) und der Vorinkubation in PK Puffer (5 min, siehe B.1.9.6) erfolgte eine 20minütige Inkubation in Proteinase K (2µg/ml in PK Puffer) bei RT. Nachdem die OT erneut gewaschen wurden (4x 5 min in Waschpuffer), wurden sie mit Hybridisierungspuffer für 1 h bei 64 °C in einer feuchten Kammer vorhybridisiert (60 µl / OT). Anschließend wurden 200 ng/ml DIG markierte RNA (in Hybridisierungspuffer, denaturiert für 5 min 80 °C) auf die Schnitte pipettiert und über Nacht bei 64 °C inkubiert.

Nach der Hybridisierung wurden unspezifische Bindungen der DIG-RNA auf den Schnitten durch eine Serie von Waschschrritten reduziert (3-mal 5 min mit SSC Waschpuffer I (siehe B.1.9.6), 64°C; 5-mal 10 min mit Formamid I (siehe B.1.9.6), 64°C; 5-mal 10 min mit Formamid II (siehe B.1.9.6), 64°C; 3-mal 5 min mit SSC Waschpuffer II (siehe B.1.9.6), 64°C; 3-mal 5 min mit SSC Waschpuffer II, RT). Anschließend wurden die OT 3-mal 5 min in 1 x TN Puffer (siehe B.1.9.6) gewaschen und freie Bindungsstellen durch Inkubation mit 4 % Ziegen Serum (NGS) in 1x TN-Puffer bei 4 °C über Nacht blockiert. Daraufhin wurden die Schnitte mit Anti-DIG-Fab-AP Antikörperlösung (1:2000 in 1xTN Puffer mit 4% NGS) für 1 h bei RT inkubiert und anschließend 3-mal 15 min in Maleatpuffer (siehe B.1.9.6) gewaschen. Um den optimalen pH Wert der alkalischen Phosphatase im Gewebeschnitt einzustellen, wurden die OT 5 min mit AP-Substratpuffer (pH 9,5, siehe B.1.9.6) inkubiert. Anschließend wurde eine Färbelösung (siehe B.1.9.6) auf den Schnitt pipetiert und die Farbreaktion bei RT

halbstündlich kontrolliert. Bei ausreichender Färbung (1-3h) wurden die OT 3-mal 10 min in PBS und 2 mal 2 min in H₂O gewaschen, getrocknet und in Kaisers-Gelantine (Merk, Kat. Nr. 1.09242.0100) eingedeckelt.

B.2.11.5.2 DAB Färbung

Zur Darstellung von Proteinexpressionen in Gewebeschnitten und zur Anfertigung von Dauerpräparaten wurden Färbungen mit 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) durchgeführt. Dazu bindet zunächst ein „primär“ Antikörper (siehe B.1.8) spezifisch an ein Epitop des zu untersuchenden Proteins, der anschließend Bindungsziel eines „sekundären“ Biotin-gekoppelten Antikörpers (siehe B.1.8) ist. Durch die hohe Affinität von Biotin zu Avidin bindet der sekundäre Antikörper in einer nachfolgenden Reaktion spezifisch einen Avidin-Peroxidase Komplex (ABC Reagenz, siehe B.1.9.6). Die nun gebundene Peroxidase kann in einer Färbereaktion als Substrat Wasserstoffperoxid reduzieren, so dass die dabei freiwerdenden Protonen als Oxidationsmittel auf 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) wirken. DAB wird dadurch oxidiert und fällt als brauner Feststoff im Gewebe aus. Durch Zugabe von Nickelsulfat und Cobaltchlorid kann die Farbreaktion ins Violette verstärkt werden.

Zunächst musste die endogene Peroxidase durch eine 30minütige Inkubation in 0,3 % (v/v) H₂O₂ (in PB Puffer) inaktiviert werden. Anschließend wurde das H₂O₂ durch 2-mal 10 min Waschen in PB Puffer entfernt und unspezifische Antikörperbindungsstellen durch eine 1-stündige Inkubation mit Blockierungslösung (siehe B.1.9.6) bei RT blockiert. Daraufhin wurde der Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung (siehe B.1.8) in 5 % normalem Ziegen Serum (NGS, Vector, Kat. Nr. S-100) über Nacht mit dem Schnitt bei 4 °C inkubiert. Nachdem die Gewebeschnitte 5-mal 10 min bei RT in PB Puffer gewaschen wurden, wurde der entsprechende sekundäre Biotin-gekoppelte Antikörper (siehe B.1.8) in einer 1:1000 Verdünnung (in PB Puffer) für 2 Stunden bei RT mit dem Schnitt inkubiert. Nach erneutem Waschen der Schnitte (5-mal 10 min in PB Puffer bei RT) wurden das Gewebe 1 Stunde mit ABC-Lösung (siehe B.1.9.6) inkubiert. Nicht gebundene Avidin-Peroxidase Komplexe wurden anschließend durch dreimaliges Waschen für 10 min in PB bei RT entfernt. Die frisch angesetzte DAB-Lösung (siehe B.1.9.6) wurde nun mit H₂O₂ versetzt (3,3 µl 0,3 % H₂O₂ pro ml DAB Lösung) und direkt auf die Schnitte pipettiert. Die Reaktion wurde am Mikroskop beobachtet und nach 1-3 min durch dreimaliges Spülen in PB Puffer abgestoppt. Die Gewebeschnitte wurden anschließend auf gelatinierte Objektträger (2 g Gelantine (Merck, Kat. Nr. 1.036.0250) und 0,2 g Cromalaun (Merk, Kat. Nr. 1.036.0250) pro 400 ml H₂O, 10 min Inkubation der Objektträger) aufgezogen, getrocknet, durch eine Alkoholreihe entwässert (5 min, 70 %; 5 min 80 %, 2x5 min 96 %, 2x5 min Xylol) und in Enthelan eingedeckelt.

B.2.11.5.3 Fluoreszenz Färbung

Die Fluoreszenzfärbung wurde zur Darstellung der gewebespezifischen Expression von Proteinen mittels der konfokalen Mikroskopie durchgeführt. Dazu wurde wie bei der DAB-Färbung (siehe B.2.11.5.2) der primäre, bereits am spezifischen Epitop des Proteins gebundene Antikörper (siehe B.1.8) von einem sekundären Antikörper erkannt. Zur Fluoreszenzfärbung war der sekundäre Antikörper (siehe B.1.8) mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, der bei Anregung mit einer spezifische Wellenlängen Licht höherer Wellenlänge emittieren kann.

Die Behandlung der Gewebeschnitte erfolgte wie bei der DAB-Färbung (siehe B.2.11.5.2). Die endogene Phosphatase wurde jedoch nicht durch eine Wasserstoffperoxid Behandlung inaktiviert und nach dem Auswaschen des sekundären Antikörpers wurden die Schnitte bereits auf gelatinierte Objektträger aufgezogen, in ProLong Gold (Invitrogene, Kat. Nr. P36930) eingedeckelt und bei 4 °C aufbewahrt.

B.2.11.6 Mikroskopische Auswertung

Fluoreszenzfärbungen wurden mittels des konfokalen Laserscanning Mikroskops SL von Leica mit den jeweiligen Anregungswellenlängen (488, 543 nm Laser) der an die sekundär Antikörpern gekoppelten Farbstoffe untersucht und aufgenommen. DAB Färbungen wurden am Olympus BX51 Mikroskop und der Software Magnafire fotografiert.

B.2.12 Tierexperimentelles Arbeiten

B.2.12.1 Induzierung von Anfällen durch Kainatinjektionen

Um Unterschiede in der Anfallsbereitschaft der Mäuse feststellen zu können, wurden konvulsive Anfälle durch Kainatinjektionen ausgelöst. Als Agonist für spezifische Kainat- und Glutamatrezeptoren imitiert Kainat den exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat und wirkt dadurch als Stimulanz des zentralen Nervensystems, so dass es für die Induzierung von Anfällen in Tierexperimenten eingesetzt wird [110, 111].

Während des Vormittages (9.00 -11.00 Uhr) wurden 10-12 Wochen alten männliche C57Bl/6 Mäusen Kainat (2 mg/ml PB, Sigma, Kat. Nr. K0250) in einer initialen Dosis von 20 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Die Mäuse wurden während des Versuches nach einer 5 Punkte Anfallsskala alle 15 min beurteilt (siehe Tabelle 9) (nach [111]). Nach 45 min wurde eine ergänzende Injektion (14 mg/kg Körpergewicht) injiziert. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Maus alle 5 min beurteilt. Mäuse, die Niveau 4 erreicht haben, wurden ergänzende Dosen in 60 min Intervallen gegeben. Mäuse, die Anfälle in den Niveaus 1-3 gezeigt haben, bekamen ergänzende Injektionen in 45 min Intervallen. Injektionen wurden

solange verabreicht, bis Mäuse Niveau 5 erreicht haben oder bis eine 4 Stunden Beobachtungszeit endete.

Tabelle 9. Bewertung der Anfälle nach einer 5 Punkte Anfallsskala.

Niveau	Charakteristisches Verhalten
1	Unbeweglichkeit, in einer Ecke des Käfigs verharren, starren
2	Ausgestreckte Körperhaltung, gerader und starrer Schwanz, zurückgelegte Ohren
3	Wiederholendes Kopfschütteln, aufrechte Sitzposition, Vorderpfoten auf dem Bauch
4	Generalisierter tonisch-klonischer Anfall: mehrfaches nach hinten abkippen des Körpers, dabei nesteln der Vibrissen, springen; auf der Seite liegend, starkes Bewegen der Vorder- und Hinterpfoten; unterbrochen von Perioden der totalen Ruhe.
5	Kontinuierliches Niveau 4 (Status Epilepticus, per Definition 2x5 min).

B.2.12.2 *In utero* Elektroporation

Durch *in utero* Elektroporationen konnten Genkonstrukte spezifisch in einzelnen Zellen der hippocampalen CA1 Region transferiert werden, um dort ihre codierenden Proteine exprimieren zu können. Die Technik wird in der Arbeitsgruppe von Prof. Nitsch (Charité, Institut für Zell- und Neurobiologie) durch den Tierarzt Jan Baumgart praktiziert. Dazu wurden terminiert verpaarte E15 Mäuse anästesiert. Der Uterus wird aus dem Abdomen disloziert und an zwei der Embryonen 1-1,5 µl endotoxinfreie Plasmid DNA (4 µg/µl) in einen der beiden lateralen Ventrikel mit Hilfe einer feinen Glaskapillare injiziert. Anschließend wurden die manipulierten Gehirne mit pinzetten-ähnlichen Elektroden durch fünf elektrische Pulse (38 V / 50 mS, 950 ms Intervall) elektroporiert. Der Uterus wurde danach in den Bauchraum vorsichtig zurückgeführt und die Bauchdecke vernäht.

B.2.13 Elektrophysiologische Messungen

Aufgrund der beobachteten Phänotypen der PRG-1 defizienten Mäuse wurden elektrophysiologische Messungen in Kooperation mit der AG Prof. Dr. Schmitz (Charité, Neurowissenschaftliches Forschungszentrum, NWFZ) durchgeführt. So sind *in vivo* EEG Aufnahmen durch Dr. Sebastian Schuchmann und verschiedene Messungen an hippocampalen Schnitten (intrinsische Eigenschaften der Zellen, Feldpotential Messungen, evozierte exzitatorische, postsynaptische Ströme (EPSC), miniature EPSC und miniature inhibitorische, postsynaptische Ströme (IPSC)) durch M.Sc. Prateep Beed durchgeführt worden.

B.2.14 Statistische Auswertungen

Die Signifikanz der Unterschiede zweier Versuchsgruppen wurde mittels des Student's t-Test mit MS Office Excel™ 2003 bestimmt. Bei mehreren Versuchsgruppen wurde die Signifikanz mittels einer ANOVA mit Posthoc Bonferroni Korrektur mit dem Programm GraphPad Prism v4 bestimmt. Ein $p < 0,05$ wurde als signifikant verschieden angesehen.

C ERGEBNISSE

C.1 Generierung PRG-1 defizienter Mäuse

C.1.1 Knockout Strategien

Für die Generierung PRG-1 defizienter Mäuse musste zunächst eine Übersicht über die genomische Organisation des *prg-1* Gens erstellt werden. Dazu wurden die im Internet verfügbaren Programme von NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) genutzt. Maus *prg-1* (AF541279) ist lokalisiert auf Chromosom 3 und besteht aus 7 Exons (siehe Abbildung 8). Aufgrund eines großen Introns 1 (24,5 kb) wurde nicht das Startcodon in Exon 1 deletiert, da eventuelle Promotorregionen in diesem Intron ein Start der Translation in Exon 2 ermöglichen könnten. Die Regionen, die mutmaßlich verantwortlich sind für eine Interaktion mit Lipid Phosphaten befinden sich auf Exon 4, 5 und 6. In einem konstitutiven Knockout Ansatz sollten diese Regionen mittels homologer Rekombination durch eine IRES-LacZ-MC1-Neo Kasette [103] ersetzt werden (siehe Abbildung 8). Diese Expressionskassette besaß im 5' Bereich 3 Stop Condons (TAG) in allen 3 Frames, die zum Abbruch der Translation in Exon 4 führen würde. Durch das IRES-LacZ Fragment würde die endogene Expression von PRG-1 durch die gleichzeitige Expression der β -Galactosidase dargestellt werden können.

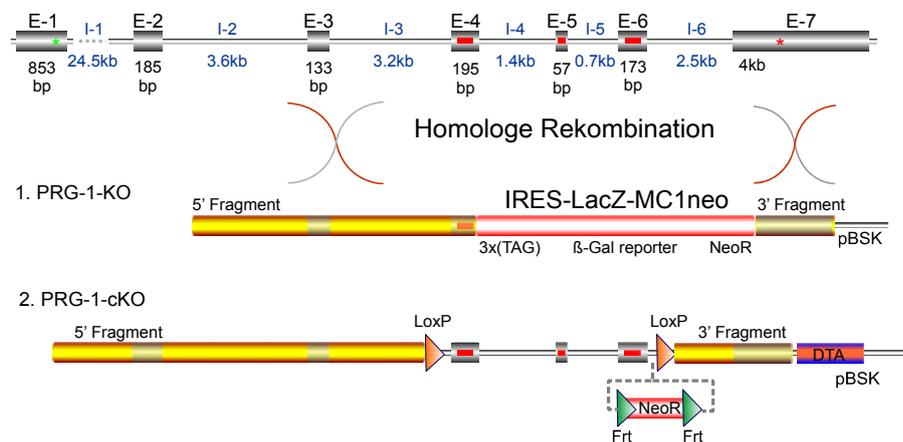


Abbildung 8. Knockoutstrategien zur Herstellung eines konstitutiven (PRG-1-KO) und eines konditionellen (PRG-1-cKO) Knockouts durch homologe Rekombination. Durch die Insertion einer IRES-LacZ-MC1neo Kasette innerhalb der genomischen Bereiche von Exon 4-6 (Interaktionsbereich mit Lipid Phosphaten (rot)) sollte ein konstitutiver Knockout hergestellt werden. Durch das Einfügen von *LoxP* sites in Intron 3 und 6 sollte das *prg-1* Gen gewebespezifisch (konditionell) durch die Expression von Cre-Rekombinase ausgeschaltet werden können. (E = Exon, I = Intron)

In einem zweiten Ansatz sollte das *prg-1* Gen durch den Einsatz der *Cre-Rekombinase* gewebespezifisch (konditionell) inaktiviert werden können. Dazu sollten in Intron 3 und Intron 6 *LoxP* sites über homologe Rekombination eingefügt werden, die bei einer Expression der Rekombinase die genomische Sequenz zwischen Exon 4 und 6 deletieren würden. Weiterhin sollte die Neomycin Selektionskassette noch in den Stammzellen durch Rekombination einer FLP Rekombinase an spezifischen FRT (FLP-recombination target) sites aus der genomischen Sequenz deletiert werden, da die Expression von Neomycin-Acetyltransferase die Keimbahntransmission stören könnte (persönliche Kommunikation, Dr. Hagen Wende, MDC-Berlin). Eine Zusammenfassung der Strategien sind in Abbildung 8 dargestellt.

C.1.2 Vektorkonstruktion des konstitutiven Knockouts

C.1.2.1 PCR der homologen DNA Fragmente

Zur Konstruktion des Zielvektors pPRG1-KO wurden homologe DNA-Fragmente aus genomischer DNA von C57BL/6 Mäusen mittels PCR amplifiziert und in einem TOPO-TA Cloning Vektor zwischenkloniert (siehe B.2.2.8.1). Das homologe 5' Fragment war 4,6 kb lang und umfasste Bereiche von Intron 2 bis Exon 4. Wahrscheinlich aufgrund der Größe des Fragments gelang es nicht, die DNA in einem Schritt zu amplifizieren. Durch Einbeziehen endogener Restriktionsschnittstellen konnte das Fragment jedoch in 3 Schritten („1-3“) zur späteren Klonierung amplifiziert werden. Das homologe 3' Fragment („4“) wurde aus Exon 7 amplifiziert und war 1.3 kb lang. Eine Übersicht und die Ergebnisse der PCR sind in Abbildung 9 dargestellt. Die benutzten Primer sind unter B.1.7.1 aufgeführt.

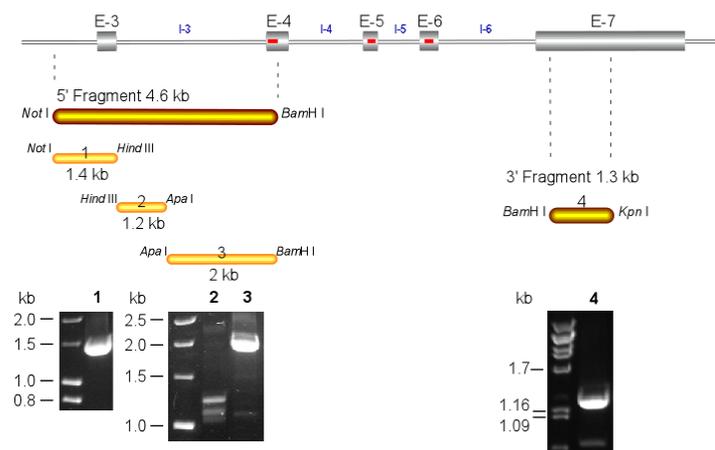


Abbildung 9. PCR der homologen Fragmente des konstitutiven KO Vektors. 5' und 3' homologe DNA Fragmente wurden von C57BL/6 genomischer Maus DNA amplifiziert („1-4“). Die Positionen der Fragmente auf dem *prg-1* Gen und Restriktionsschnittstellen sind gekennzeichnet. Das 5' Fragment wurde in 3 Teilen amplifiziert. Die Fragmente wurden in einem TOPO-TA cloning Vektor (pCR2.1-TOPO) zwischenkloniert.

C.1.2.2 Klonierung des Zielvektors pPRG1-KO

Die in pCR2.1-TOPO zwischenklonierten PCR Fragmente wurden anschließend zu dem Zielvektor pPRG1-KO zusammenligiert. Dazu wurden zunächst die Fragmente 1 und 2 über *Not* I / *Hind* III und *Hind* III / *Apa* I in pBSK, das Fragment 3 über *Bam*H I / *Not* I (*Not* I aus pCR2.1-TOPO Vektor) in pBSK-*Apa* I⁻ und das Fragment 4 über *Kpn* I / *Bam*H I in pBSK kloniert (siehe Abbildung 10 A, B und C). Die Deletion der *Apa* I Schnittstelle in pBSK-*Apa* I⁻ wurde zuvor durch Restriktion mit *Apa* I, Auffüllen der Sticky-Enden mit T4-DNA Polymerase und erneut Ligation des Vektors erreicht. Anschließend wurde das Fragment 1 und 2 über *Apa* I / *Not* I in pBSK-Frag.3 kloniert um das vollständige 5' Fragment zu erhalten (siehe Abbildung 10 B). Dieses 5' Fragment (1+2+3) wurde nun über *Bam*H I / *Not* I in pBSK-Frag.4 kloniert (siehe Abbildung 10 C). Durch Linearisierung des nun entstandenen Vektors mit *Bam*H I konnte die IRES-LacZ-MC1neo Expressionskassette aus pIRES (siehe B.1.6) über *Bam*H I eingefügt werden (siehe Abbildung 10 C). Über einen *Kpn* I Verdau konnte die Orientierung des Fragments bestimmt werden. Abbildung 10 D und E zeigen den fertigen Vektor und dessen Restriktionskarte der einzelnen Fragmente.

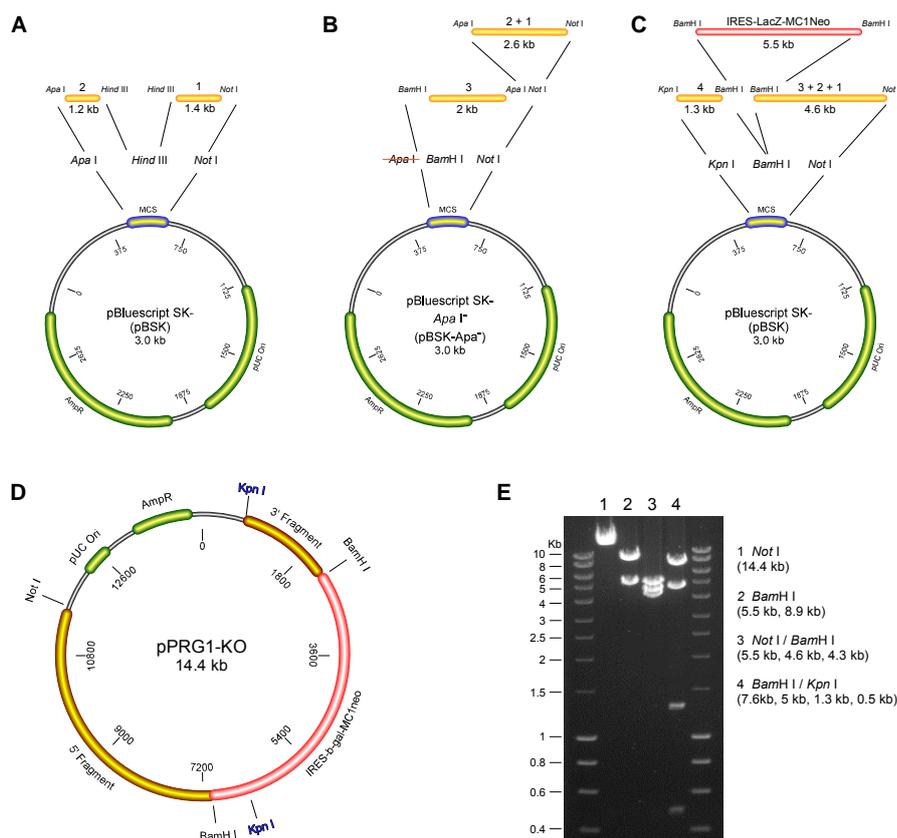


Abbildung 10. Klonierung des Zielvektors pPRG1-KO. Die homologen Fragmente 1-4 wurden in 6 Klonierungsschritten (**A-C**) zusammen mit dem IRES-LacZ-MC1neo Fragment zu dem fertigen Zielvektor (**D**) über die angegebenen Restriktionsschnittstellen kloniert. (**E**) Restriktionskarte des Zielvektors.

C.1.3 Vektorkonstruktion des konditionellen Knockouts

C.1.3.1 PCR der homologen Bereiche der Rekombinationsvektoren

Für die Konstruktion des konditionellen Zielvektors sollte die Möglichkeit der Rekombination von doppelsträngiger DNA in *E. coli* Zellen, vermittelt durch die hitzeinduzierbare Expression von Red-Proteinen des Bakteriophagen Lambda, genutzt werden, so dass das Einbringen der *LoxP* sites und der Selektionskassette in den Vektor unabhängig von endogenen Restriktionsschnittstellen geschehen konnte [102]. Hierzu mussten zunächst 6 kurze homologe DNA Fragmente aus der genomischen *prg-1* Sequenz amplifiziert werden. Anschließend sollten diese Fragmente aus TOPO-TA cloning Vektoren in Rekombinationsvektoren kloniert werden. Die Amplifikation der DNA erfolgte von einem BAC (RP23-340J18), der Maus *prg-1* Sequenz enthielt. Durch die Wahl der homologen Bereiche wurde die Größe des Vektors, die Lage der *LoxP* sites und somit die Größe der 5' und 3' homologen Bereiche (10 kb 5' Fragment, 3,5 kb 3' Fragment) und die Restriktionsschnittstelle (*Spe* I), die später zum Screenen positiv rekombinierter Stammzellen dienen sollte, definiert. In Abbildung 11 ist eine Übersicht der einzelnen Amplifikate und deren Position innerhalb der *prg-1* Sequenz dargestellt. Die benötigten Primer sind unter B.1.7.6 aufgeführt.

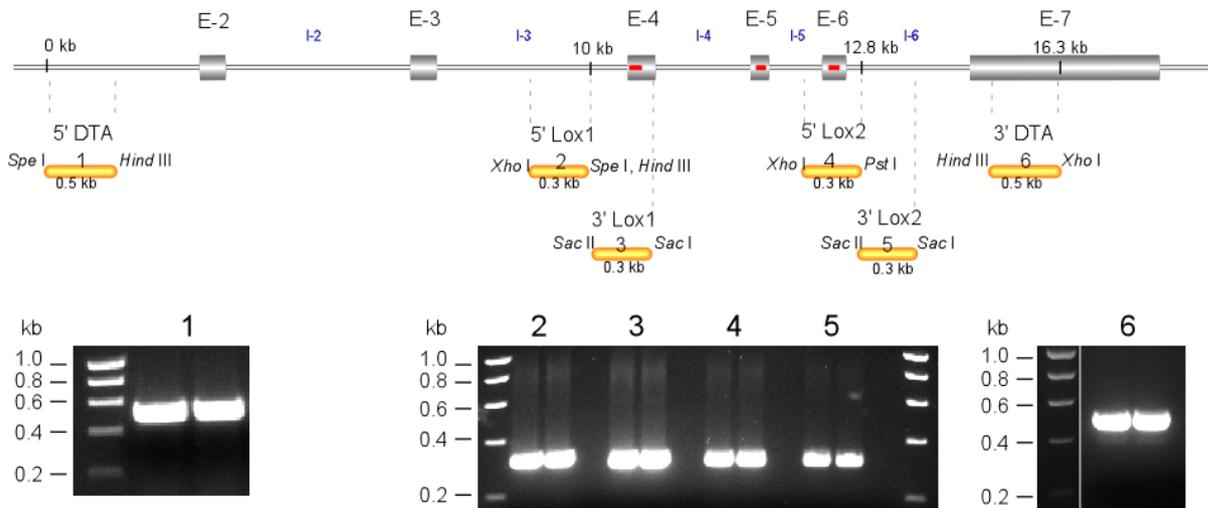


Abbildung 11. PCR der homologen DNA Fragmente der Rekombinationsvektoren. Es sind die Fragmentlängen, die angefügten Restriktionsschnittstellen und der Bezug zur *prg-1* Sequenz dargestellt. Insgesamt mussten 6 Fragmente amplifiziert werden, die dadurch die Größe der homologen Bereiche des Vektors (5' und 3' Fragment) und die Lage der *LoxP* sites definierten. Das 5' Fragment (siehe Abbildung 8) wäre demzufolge 10 kb lang. Das 3' Fragment wäre 3,5 kb lang. Die Cre-Rekombinase müsste zwischen den *LoxP* sites eine Sequenz mit der Länge von 2,8 kb deletieren (Exon 4 – Exon 6).

C.1.3.2 Klonierung der Rekombinationsvektoren

In einem nächsten Schritt wurden die 6 homologen Fragmente in die Rekombinationsvektoren pNEO und pDTA (siehe B.1.6) kloniert, um die Vektoren pNEO-Lox1, pNeo-Lox2 und pDTA-5'+3' zu generieren. Dabei wurde das Fragment 2 über *Xho* I / *Hind* III und das Fragment 3 über *Sac* II / *Sac* I in pNeo kloniert (siehe Abbildung 12 A). Eine zusätzliche *Spe* I Schnittstelle wurde dadurch 5' zur ersten *LoxP* site eingefügt. Das Fragment 4 wurde über *Xho* I / *Pst* I und das Fragment 5 über *Sac* II / *Sac* I in pNeo kloniert, so dass die erste 5' *LoxP* site aus pNeo entfernt wurde (siehe Abbildung 12 B). Die Fragmente 1 und 6 wurden in den pDTA Vektor über *Spe* I / *Hind* III (Frag.1) und *Hind* III / *Xho* I kloniert (siehe Abbildung 12 C), um als Ausgangsplasmid des pPRG1-cKO Vektors zu dienen (siehe C.1.3.3).

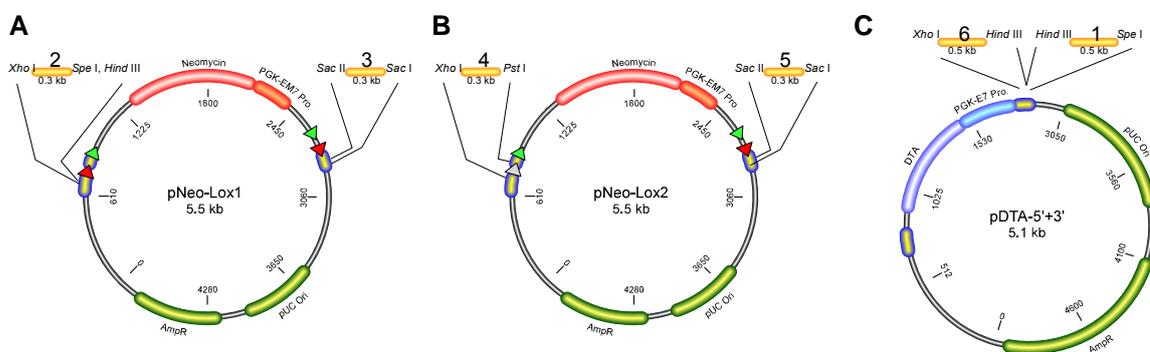


Abbildung 12. Schematische Darstellung der Klonierung der Rekombinationsvektoren. Die homologen Fragmente 1-6 wurden über die angegebenen Restriktionsschnittstellen in die Vektoren pNeo und pDTA kloniert, um pNeo-Lox1 (A), pNeo-Lox2 (B) und pDTA-5'+3' (C) zu erhalten. Rotes Dreieck repräsentiert eine *LoxP* site. Grünes Dreieck eine FRT site. (A) pNeo-Lox1 enthält zusätzlich eine *Spe* I Restriktionsschnittstelle upstream der ersten *LoxP* site. (B) Fragment 4 wurde so in pNeo kloniert, dass die erste *LoxP* site deletiert wurde (graues Dreieck). (C) pDTA-5'+3' kann nun durch eine einzelne *Hind* III Restriktionsschnittstelle geöffnet und linearisiert werden.

C.1.3.3 Rekombinationen zum Zielvektor pPRG1-cKO

Um die genomische *prg-1* Sequenz in den Zielvektor zu rekombinieren, wurde in einem ersten Schritt der BAC RP23-340J18 (RZPD), der die genomische Sequenz trägt, in DY380 Zellen elektroporiert. Durch einen *EcoR* V Kontrollverdau vor und nach der Elektroporation wurde sichergestellt, dass der BAC während der Transformation nicht zerstört worden ist (siehe Abbildung 13 D). Anschließend wurde das durch *Hind* III linearisierte Plasmid pDTA-5'+3' in rekombinationskompetente DY380+BAC Zellen elektroporiert. Durch Red-vermittelte homologe Rekombination der Fragmente 1 und 6 mit der BAC DNA kommt es in den Bakterien zu einem „Gap Repair“, der das Plasmid über die *prg-1* Sequenz schließt und somit dazu führt, dass die Bakterienzelle neben der Chloramphenicol Resistenz des BACs

auch eine Ampicillin Resistenz trägt. Nun kann nach der Selektion auf Ampicillin und der erneuten Transformation des Plasmid (pDTA-BAC) in DY380 Zellen die erste *LoxP* site in die *prg-1* Sequenz rekombiniert werden. Dazu musste pNeo-Lox1 über einen *Xho* I / *Sac* I Verdau geschnitten werden und das Frag.2-Neomycin-Frag.3 Fragment (siehe Abbildung 12 A) in rekombinationskompetente DY380 Zellen (mit pDTA-BAC) elektroporiert werden. Durch die Rekombination des Neomycin Fragments, welches unter der Kontrolle eines Hybrid Promoters (siehe B.1.6) steht, können positiv rekombinierte Zellen durch Wachstum auf Kanamycin Platten selektioniert werden. Durch die anschließende Elektroporation des neuen Plasmides pDTA-Neo-Lox1 in Cre-induzierte EL350 Zellen wird die Neomycin Sequenz durch Cre-Rekombinase deletiert, die eine einzelne *LoxP* site hinterlässt. Durch erneute Elektroporation in DY380 Zellen werden „reine“ Klone (keine Mischklone: 2 Plasmide pro Zelle (mit und ohne Neomycin)) erhalten. Durch die nun anschließende Elektroporation des Frag.4-Neomycin-Frag.5 Fragments aus pNeo-Lox2 (*Xho* I / *Sac* I Verdau) in rekombinationskompetente DY380 Zellen (mit pDTA-Lox1) entsteht der fertige konditionelle Knockout Vektor pPRG1-cKO, der wiederum auf Kanamycin selektionierbar ist. Um das fertige Plasmid zu testen, kann es nun in Cre oder FLP induzierte EL350 bzw. EL250 Zellen elektroporiert werden. In Abbildung 13 sind die wesentlichen Schritte der Rekombinationen zusammengefaßt.

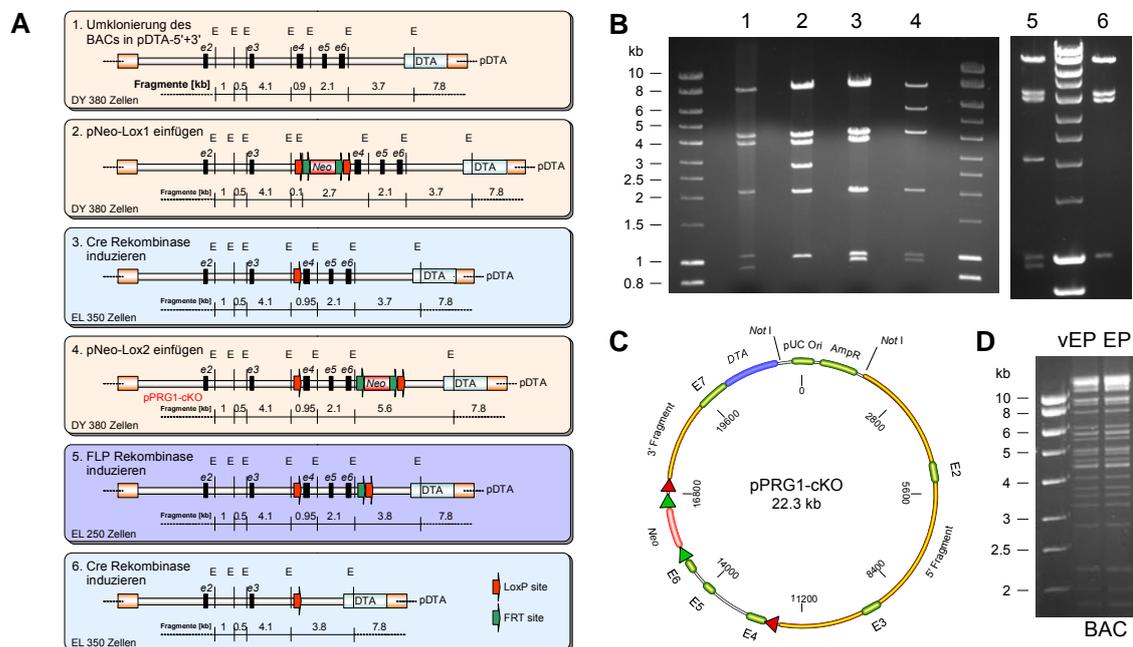


Abbildung 13. Rekombinationen zum Zielvektor pPRG1cKO. (A) Die Schritte der Rekombinationen in den einzelnen Zellen sind dargestellt. (B) Kontrollverdau der verschiedenen Plasmide mit *Eco*R I (E in A). (C) Schema des fertigen Vektors. Über *Not* I können nicht benötigte Sequenzen, wie Ori und Ampicillin Resistenz, entfernt werden. (D) Kontrolle des BACs mit *Eco*R V vor (vEP) und nach der Elektroporation (EP) in DY380 Zellen.

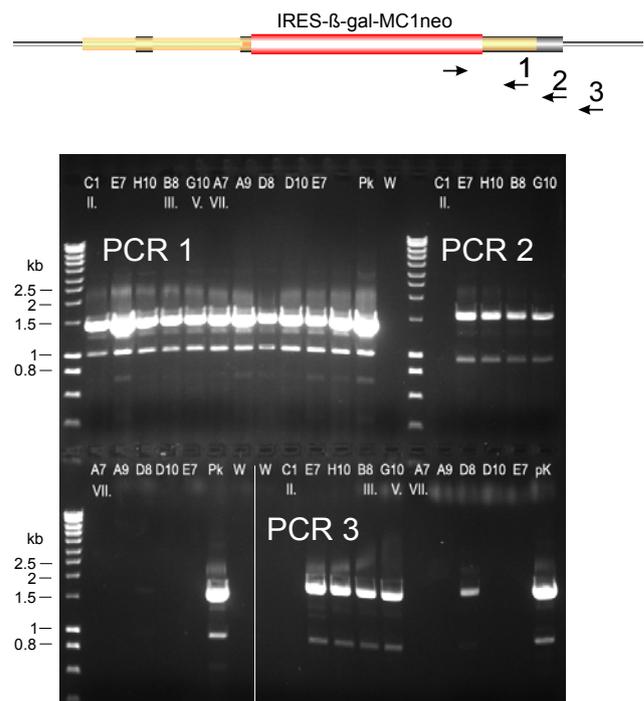
C.1.4 Screening embryonaler Stamm (ES)-Zellen

Die fertigen Konstrukte für den konstitutiven und den konditionellen KO wurden jeweils mit *Not I* linearisiert, Phenol/Chloroform aufgereinigt und in einer Konzentration von 1 µg/µl in E14Tg2a embryonale Stammzellen elektroportiert. Die Elektroporation und die anschließenden Zellkulturarbeiten geschahen für den konstitutiven KO in Kooperation in der Arbeitsgruppe von Prof. M. Sendtner an der Universität Würzburg durch Dr. Stefan Wiese; für den konditionellen KO in der Arbeitsgruppe von Prof. C. Birchmeier am Max-Delbrück-Centrums für Molekulare Medizin (Berlin, Buch) durch Dr. Elvira Rohde.

C.1.4.1 Stammzellen für den Konstitutiven Knockout

Für den konstitutiven KO wurden insgesamt 672 (7x96 Well Platten) G418 (Neomycin / Kanamycin Analogon) resistente Stammzellklone nach korrekter homologer Rekombination gescreent. Aufgrund der Länge des homologen 3' Fragmentes (1,3 kb) wurde die PCR als Screening Methode eingesetzt. Hierbei befand sich der 5' Primer im *neo* Gen und der 3' Primer extern (nicht auf dem 3' Fragment) in Exon 7 (siehe Abbildung 14, Primer 2). 10 Kandidatenklone wurden in einer ersten PCR als positiv rekombiniert identifiziert. Sie ergaben in dieser Screening-PCR eine Bande von ca. 1,6 kb. Diese Klone wurden erneut angezogen und vermehrt, um sie in einer weiteren PCR und durch Southern Blots zu analysieren. In Abbildung 14 ist die PCR dieser Klone dargestellt. Die Primer sind unter B.1.7.4 aufgeführt. PCR 1 zeigt, dass alle Klone das Neo-3'Fragment integriert haben, jedoch zeigt PCR 2 und 3, dass nur 5 dieser 10 Kandidatenklone den 3' Bereich des Vektors an der richtigen Stelle rekombinierten.

Abbildung 14. Screening PCRs auf positiv getestete ES-Zellen. Der 5' Primer liegt im *neo* Gen. PCR 1-3 nutzen verschiedene 3' Primer. PCR-1 3' Primer im 3' Fragment. Bei PCR 2-3 liegen alle 3' Primer außerhalb des Konstrukts (gelbe Markierung). Alle Klone haben das Konstrukt integriert (PCR1), jedoch nur 5 Klone (E7, H10, B8, G10, D8) zeigen korrekte Integration des 3' Bereiches des Transgens (PCR2-3). (pK, positiv Kontrolle (Plasmid); W, ohne Template)



Um diese Klone weiter zu verifizieren, wurden Southern Blots mit radioaktiv markierten Sonden gegen den 5' Bereich, 3' Bereich und gegen das *neo* Gene durchgeführt. Die notwendigen externen Sonden (keine Homologien zum Konstrukt pPRG1-KO) für die 5' Probe und die 3' Probe wurden aus C57BL/6 genomischer DNA amplifiziert und in TA-cloning Vektoren kloniert (Primer siehe B.1.7.2). Die interne *neo* Probe wurde über einen *Nco* I Verdau aus pNeo isoliert (ca. 700 bp).

Nach Restriktionsverdau der genomischen DNA dieser Klone mit *Xba* I / *Bam*H I sollte die 5' Probe mit einem 9,8 kb Fragment im Wildtyp (WT) und mit einem 6,7 kb Fragment im KO Allel hybridisieren. In einem *Eco*R I Restriktionsverdau sollte die 3' Probe im WT mit einem 6 kb und im KO Allel mit einem 4,1 kb Fragment hybridisieren. Die Neo Probe würde in dem gleichen *Eco*R I Verdau ebenfalls das 4.1 kb Fragment des KO Allels hybridisieren. In Abbildung 15 sind die Ergebnisse der Southern Blots dargestellt. Wie bereits durch die vorherige PCR erwartet, sind nicht alle Klone korrekt integriert. Die interne Neo Probe zeigte mehrfache unspezifische Integrationen des Transgens. Insgesamt konnten nur 3 Klone identifiziert werden, die im 5' Bereich und 3' Bereich des Konstruktes an dem richtigen Rekombinationsort integrierten. Der Stammzellklon II-H10 besaß korrekte Integrationen des Transgens und wurde ausgewählt für die Blastocysteninjektionen zur Generierung chimärer Mäuse.

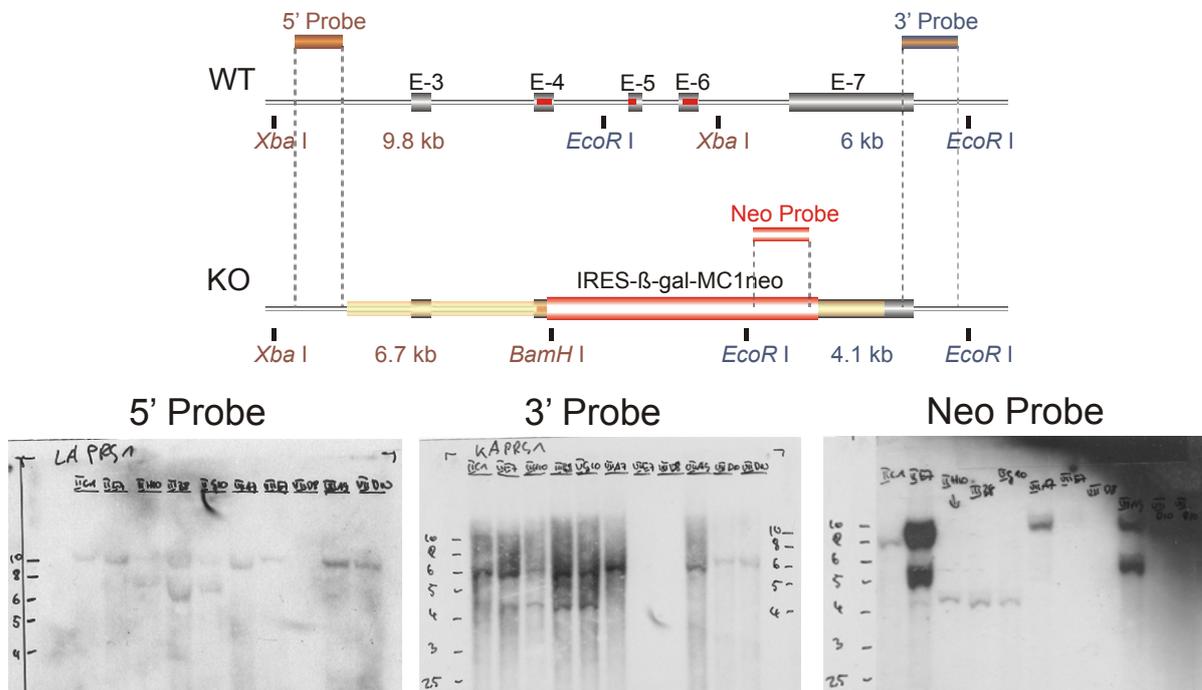


Abbildung 15. Southern Blots der positiv getesteten ES-Zell Lysate für PRG-1-KO. Oben: Schema der Restriktion mit jeweiligen Fragmentgrößen und Lage der einzelnen Proben. Gelbe Markierung im KO symbolisiert die Länge des Konstrukts. Unten: Ergebnisse der Hybridisierungen. Klon II-H10 wurde ausgewählt zur Blastocysteninjektion.

C.1.4.2 Stammzellen für den konditionellen Knockout

Aufgrund der Länge der 5' und 3' Fragmente konnte für das Screening der konditionellen ES-Zellklone nicht die PCR als Screeningmethode angewendet werden. Alle Klone wurden daher mit Southern Blot Hybridisierungen untersucht. Die externen 3' und 5' Proben wurden aus der BAC DNA amplifiziert und in TA-cloning Vektoren kloniert (Primer siehe B.1.7.7). In einem ersten Screen wurden 480 G418 resistente Klone (5x96 Well Platten) durch Verdau mit *Spe I* und Hybridisierung der 3' Probe untersucht. Dabei wurden 11 positive Kandidaten gefunden, die anschließend für weitere Verifizierungen durch Southern Blot Analysen vermehrt wurden. Die 5' Probe sollte bei einem Verdau der DNA mit *Spe I* mit einem 18,5 kb Fragment im WT und einem 11 kb Fragment in rekombinierten Allel hybridisieren. Die 3' Probe sollte ebenfalls bei einem Verdau mit *Spe I* 18,5 kb im WT, jedoch 9,4 kb im konditionellen KO Allel ergeben. Die interne Neo Probe (*Pst I* / *BamH I* Fragment von pNeo) sollte bei einem *Spe I* Verdau die gleiche 9,4 kb Bande hybridisieren wie die 3' Probe. In Abbildung 16 sind die Ergebnisse dieser Analysen dargestellt. Die interne Neo Probe zeigte neben richtigen Integrationen auch unspezifische Mehrfach-Integrationen. Es zeigte sich, dass insgesamt 7 Kandidaten positiv rekombiniert waren (Klon 1, 3, 4, 6, 9, 10, 11).

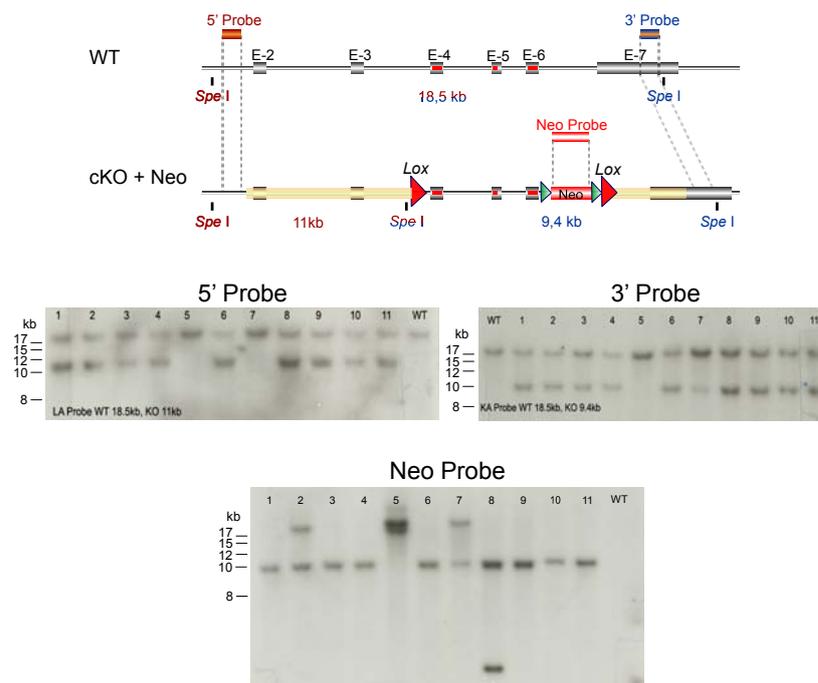


Abbildung 16. Southern Blot Analysen der positiv getesteten Kandidatenklone für PRG-1-cKO. Oben: Schema der Restriktion mit jeweiligen Fragmentgrößen und Lage der einzelnen Proben. Unten: Ergebnis der Hybridisierungen. Insgesamt waren 7 Klone richtig rekombiniert. Die interne Neo Sonde zeigte bei Klon 2, 5, 7, 8 zusätzliche, unspezifische Integrationen. Klon 1 (P1G12), 4 (P4G11) und 9 (P5F8) wurden für die anschließende FLPe Rekombination weiter verwendet.

Nach diesem ersten Screening wurden 3 positiv rekombinierte Klone ausgewählt zur weiteren Rekombination mittels FLPe Rekombinase. Die Klone 1 (P1G12), 4 (P4G11) und 9 (P5F8) wurden mit einem FLPe Expressionsplasmid (pCAAGSFLpe [112]) transfiziert und auf G418 freiem Medium ausgesät. Die FLPe Expression führte an den im 5' und 3' Bereich des *neo* Gens befindlichen *frt* sites zur Rekombination und damit zur Deletion des Gens. Die externe 3' Probe sollte im Fall einer *neo* Deletion bei einem *Spe* I Verdau mit einem um 2 kb kleineren Fragment hybridisieren (siehe Abbildung 17, grünes Dreieck). Insgesamt wurden 864 Klone per Southern Blot mit der 3' Probe gescreent (9x96; 3x96 Well pro transfizierten Klon). Es wurden 17 Kandidatenklone identifiziert, bei denen *neo* deletiert war. Diese Klone wurden wiederum vermehrt und erneut per Southern Blot getestet. In Abbildung 17 ist das Ergebnis dieser Analyse dargestellt. Klon 13 wurde als Mischklon identifiziert. Alle übrigen Klone waren richtig rekombiniert. Eine zusätzliche Hybridisierung des Blots mit der *neo* Sonde zeigte ebenfalls, dass Neo deletiert wurde (nicht dargestellt). Die Klone 5 (F8E1), 11 (G11E12) und 14 (G12A8) wurden für die Blastocysteninjektion ausgewählt.

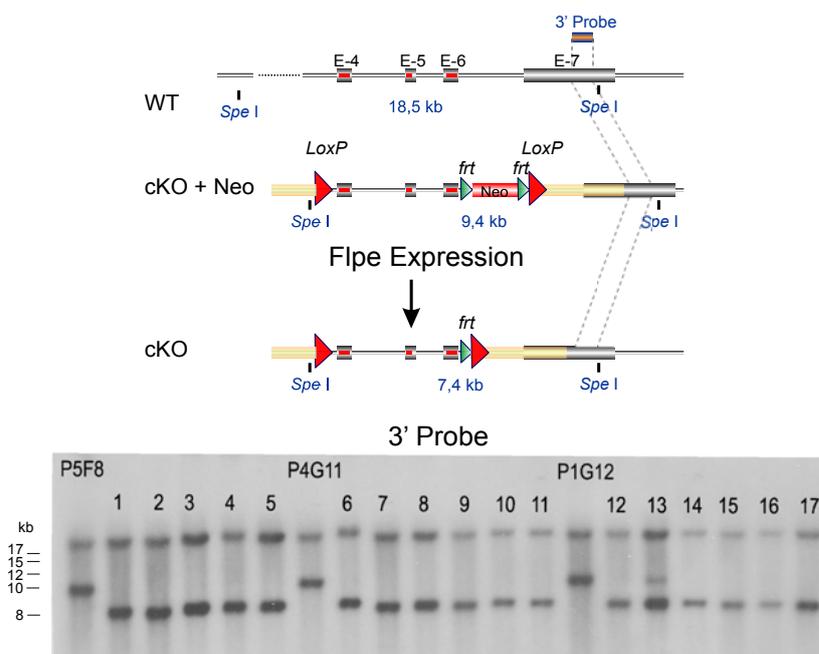


Abbildung 17. Southern Blot der positiv getesteten Kandidatenklone nach *Flpe* Transfektion von 3 positiven Klonen (P5F8, P4G11, P1G12) des ersten Screens. Oben: Schema des Southern Blots mit den einzelnen Fragmentgrößen bei einem *Spe* I Verdau und Lage der eingesetzten 3' Sonde. Die Expression der Flpe Rekombinase in den Stammzellen führt zur Rekombination an den eingefügten *frt* sites im 5' und 3' Bereich des *neo* Gens, zur Deletion des Gens und damit zur Verkürzung des hybridisierten Restriktionsfragments um 2 kb. Unten: Ergebnisse des Southern Blots. Nur Klon 13 wurde als Mischklon identifiziert. Alle anderen 16 Klone waren positiv rekombiniert.

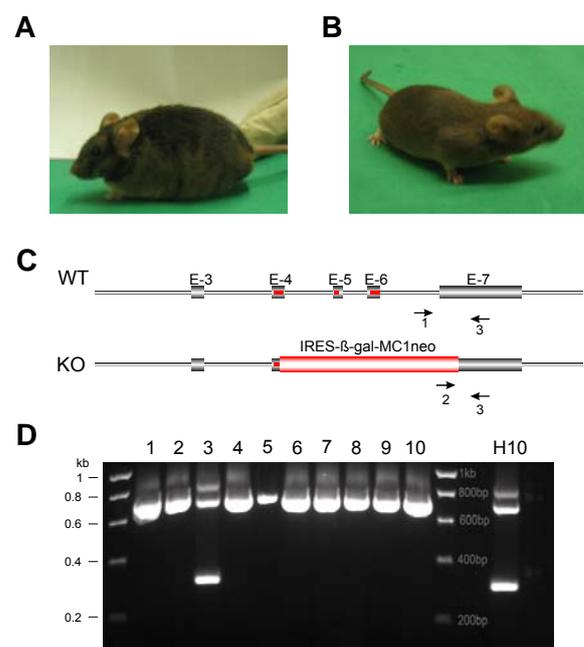
C.1.5 Generierung chimärer Mäuse und Keimbahntransmission

Die Injektionen positiv rekombinierter embryonaler Stammzellen in Blastozysten sowie der Transfer der manipulierten Blastozysten in die Uteri scheinchwangerer Weibchen wurden für den konstitutiven Knockout von Dr. Bettina Holtmann (Universität Würzburg) und für den konditionellen Knockout von Dr. Boris Jerchow / Katja Becker (Transgene Core Facility, MDC, Berlin) durchgeführt. Da die verwendeten E14tg2a Stammzellen auf dem 129Ola Stamm basierten, der das gegenüber der schwarzen Fellfarbe der C57BL/6 Blastozysten dominante Agouti Gen *aw* besitzt, konnte der Anteil der injizierten ES-Zellen zur Entwicklung der chimären Nachkommen anhand des Fellfarbenschimärismus abgeschätzt werden. Durch die Verpaarung der chimären (braun/schwarzen) Mäuse mit C57BL/6-Weibchen (schwarze Fellfarbe) konnte die Keimbahntransmission der transgenen Stammzelle durch das Auftreten von vollständig agoutifarbenen Nachkommen nachgewiesen werden.

C.1.5.1 Konstitutiver Knockout PRG-1-KO

Insgesamt konnten 2 chimäre Männchen von dem Stammzellklon II-H10 generiert werden. Bei einem Männchen erfolgte Keimbahntransmission bei der Verpaarung mit C57BL/6 Weibchen. Nachdem das Männchen bereits 11-mal Nachkommen gezeugt hatte, wurde ein agoutifarbenes Tier in einem Wurf von 10 Tieren geboren. Dieses Tier wurde anschließend zusammen mit den Geschwistertieren auf das Vorhandensein der Neomycin Kasette durch PCR der Schwanzbiopsin untersucht (Primer der PCR unter B.1.7.5). In Abbildung 18 ist das Ergebnis der Genotypisierung dargestellt. Die agoutifarbene männliche Maus besaß das Transgen und konnte nun für die Aufzucht der Mauslinie PRG-1-KO durch Verpaarung mit C57BL/6 Weibchen eingesetzt werden.

Abbildung 18. Keimbahntransmission der PRG-1-KO Maus. (A) Chimäres Männchen von II-H10. (B) Keimbahntransmission von (A) ergibt erstes heterozygote PRG-1-KO Tier (agouti) in der 11. Verpaarung mit C57BL/6 Weibchen. (C) Schema der Genotypisierungs-PCR zum Nachweis des Neo Gens. (D) Ergebnis der Genotypisierungs-PCR. Nummer 3 (B) besaß das Transgen. H10 ist Positiv Kontrolle. (WT 706bp, KO 305 bp)



C.1.5.2 Konditioneller Knockout PRG-1-cKO

Für den konditionellen KO wurden 3 Stammzellklone für die Generierung der chimären Mäuse eingesetzt (F8E1, G11E12, G12A8). Lediglich die Injektion des Klons G12A8 ergab Chimäre Mäuse (5 Tiere). Bereits der erste Wurf einer dieser Mäuse wies agoutifarbene Tiere auf. Die Genotypisierung der Schwanzbiopsien ergab, dass unter 14 Tieren 9 Tiere waren, deren Ursprung der Stammzellklon G12A8 war und die zusätzlich dessen konditionelles KO Allel trugen (Primer der Genotypisierung siehe B.1.7.8). Die Ergebnisse der Genotypisierungen sind in Abbildung 19 dargestellt. Heterozygot gefloxt Mäuse (enthalten *LoxP* sites) wurden anschließend mit C57BL/6 Mäusen zur Aufzucht des Mausstammes PRG1-cKO verpaart.

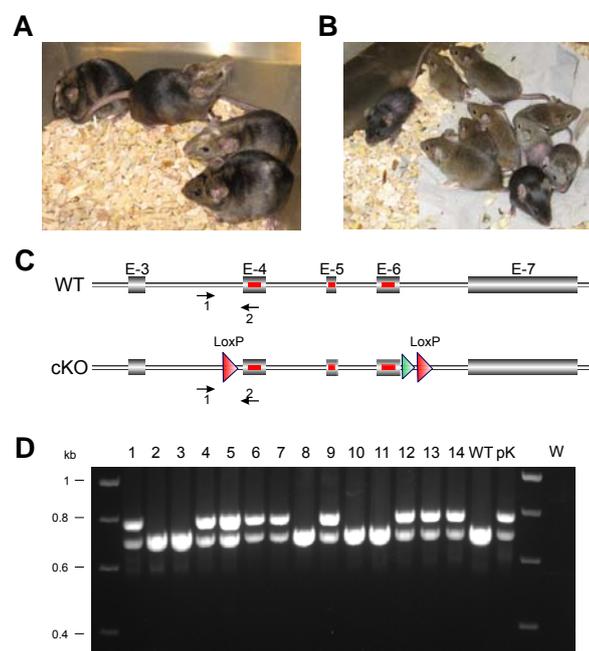


Abbildung 19. Keimbahntransmission der PRG-1-cKO Maus. **(A)** 4 der 5 chimären männlichen Tiere des Klons G12A8. **(B)** Keimbahntransmission bei Verpaarung mit C57BL/6 Weibchen bei einem der chimären Männchen. **(C)** Schema der Genotypisierungs-PCR der Schwanzbiopsien. Amplifikation der ersten *LoxP* site mit Primer 1 und 2 ergibt im konditionellen Allel eine Fragmentgröße von 771 bp; im WT ein Produkt von 698 bp. **(D)** Ergebnis der Genotypisierungs-PCR. 9 von 14 Tieren weisen die erste *LoxP* site, und damit Keimbahntransmission auf (pk = positiv Kontrolle, G12A8 Klon; W = Wasserspur).

C.1.6 Verifizierung der Knockout Mäuse

C.1.6.1 Konstitutiver Knockout PRG-1-KO

Die Verifizierung der KO Mäuse geschah durch Analyse der *prg-1* Transkription, PRG-1 Translation und per PCR Analyse der genomischen DNA. Für die Verifizierung des KOs per

Northern Blots wurden 3 radioaktiv markierte Sonden (P1-P3) hergestellt. Sonde P1 wurde aus cDNA mit den unter B.1.7.3 aufgeführten Primern amplifiziert und umfasste die deletierten Bereiche von Exon 4 bis Exon 6. Probe P2 war die externe 3' Probe, die bereits für den Southern Blot benutzt wurde. Probe P3 war ein ca. 800 bp *EcoR V* / *Sac I* Restriktionsfragment des Plasmides pIRES und umfasste Bereiche der *LacZ* Expressionskassette. In Abbildung 20 A sind die Ergebnisse der Northern Blots dargestellt. In homozygoten KO Mäusen bindet die P1 Probe keine *prg-1* Sequenz. Die Proben P2 und P3 zeigen, dass das *prg-1* Transkript im KO Allel aufgrund der Insertion der IRES-LacZ-MC1neo Kassetten um ca. 5 kb vergrößert wurde.

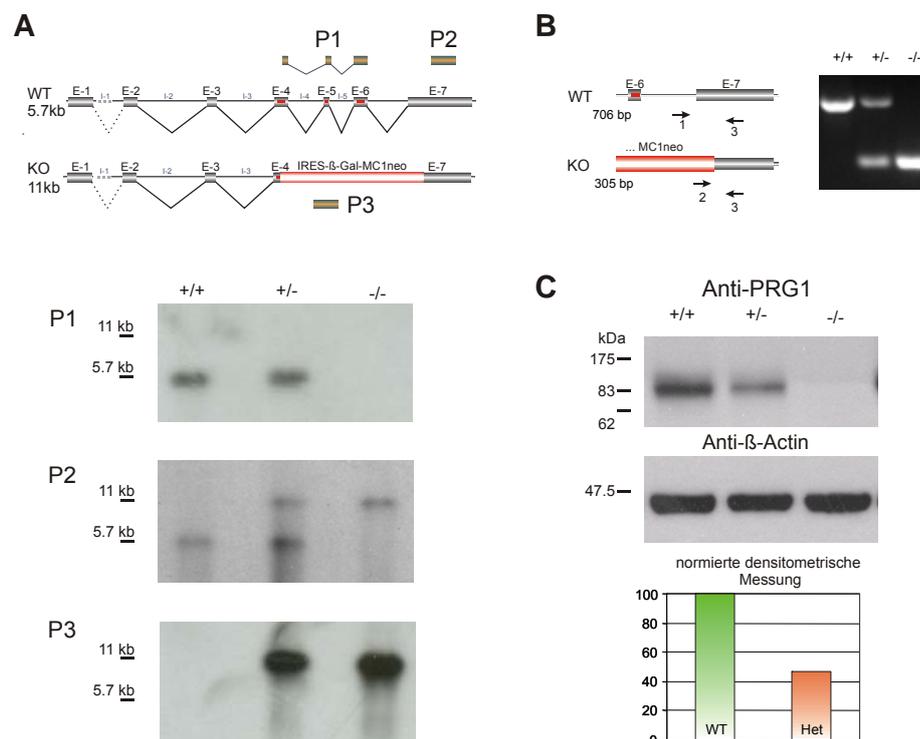


Abbildung 20. Verifizierung der PRG-1-KO Maus. **(A)** Northern Blot Analysen. Die interne *prg-1* Sonde P1 zeigt im -/- KO aufgrund der Deletion der Exons E4-E6 kein Signal. Die externe Sonde P2 und die *LacZ* Sonde P3 zeigen aufgrund der Transgenintegration eine Vergrößerung des *prg-1* Transkriptes um ca. 5 kb. **(B)** Genotypisierungs-PCR. 3 Primer wurden in einer Multiplex-PCR eingesetzt (siehe B.1.7.5). Der nur auf WT DNA bindende Primer 1 ergab mit Primer 3 eine Bande von 706 bp. Der *neo* Gen spezifische Primer 2 amplifiziert mit Primer 3 ein Produkt von 305 bp. Die WT Bande ist im -/- KO nicht mehr nachweisbar. **(C)** Western Blots von Gehirnhomogenat. Aufgrund der eingefügten 3 Stopp-Codons in Exon 4 kommt es zu einem Translationsstopp, so dass keine Immunreaktion des PRG-1 Antikörpers im homozygoten KO nachweisbar ist. Durch Vergleich mit der Ladungskontrolle β-Actin wird deutlich, dass PRG-1 gendosisabhängig exprimiert wird (unten: Densitometrische Auswertung).

Der anti-PRG-1 Antikörper zeigte im Western Blot im homozygoten KO Tier keine Immunreaktivität (siehe Abbildung 20 C), da die 3 eingefügten Stopp-Codons (TAG) den

Abbruch der Translation in Exon 4 bewirkten. Interessanterweise konnte durch Vergleich mit der Ladungskontrolle β -Actin festgestellt werden, dass PRG-1 gendosisabhängig exprimiert wird. Nur noch etwa halb soviel Protein konnte im heterozygoten Tier nachgewiesen werden.

C.1.6.2 Konditioneller Knockout PRG-1-cKO

Für die Verifizierung des konditionellen KOs war es nötig, diesen zunächst mit Cre-Deleter Mäusen zu verpaaren. Diese Mäuse exprimieren Cre-Rekombinase innerhalb ihrer Keimbahn, so dass Verpaarungen mit geflochtenen Mäusen zu Rekombinationen innerhalb der *LoxP* sites führen [113]. Exon 4 bis Exon 6 von *prg-1* werden somit durch die Rekombination von Cre komplett deletiert (siehe Abbildung 21 A und B).

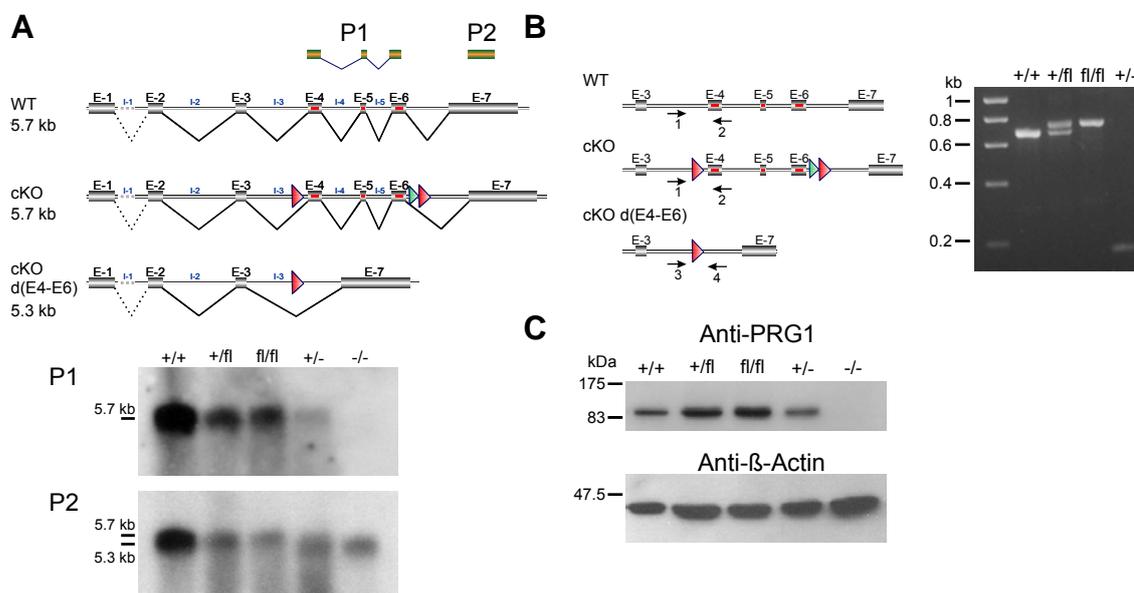


Abbildung 21. Verifizierung der PRG-1-cKO Maus. Die Integrationen der *LoxP* sites haben keine Auswirkungen auf die *prg-1* Transkription und Translation. **(A)** Northern Blots. Probe P1 hybridisiert mit dem *prg-1* transkript beim WT, +/fl, fl/fl, +/- . Die externe Probe P2 zeigt, dass Exon 3 zu Exon 7 spleißt. Ein kürzeres Transkript bei -/- ist erkennbar. **(B)** Genotypisierungs-PCRs. Die PCR erfolgte mit Primer 1 und 2 über die erste *LoxP* site (WT: 698 bp, cKO: 771 bp). Die Cre-Rekombination in Cre-Deleter Mäusen konnte durch Primer 3 und 4 nachgewiesen werden (cKO d(E4-E6): 180 bp; Primer siehe B.1.7.8). **(C)** Western Blots von Gehirnhomogenat. PRG-1 Protein ist in geflochtenen Mäusen nachweisbar, jedoch nicht im homozygot rekombiniertem Allel (-/-).

Ob das Integrieren der *LoxP* und *frt* site Auswirkungen auf die *prg-1* Transkription und Translation hatte, wurde durch Northern Blot und Western Blot Analysen mit der internen Probe P1, der Externen Probe P2 (siehe C.1.6.1) und dem PRG-1 Antikörper (siehe B.1.8) überprüft (siehe Abbildung 21 A und C). Probe P1 erkennt im geflochtenen und im heterozygot rekombinierten Allel das *prg-1* transkript (+/fl, fl/fl, +/-). Im homozygoten KO wird kein Fragment hybridisiert. Durch das Spleißen zwischen Exon 3 mit Exon 7 im KO Allel zeigt die

externe Probe P2 ein kleineres Fragment im heterozygoten und homozygoten KO als der WT (ca. 5,3 kb als 5,7 kb). Die Proteinexpression von PRG-1 ist im geflochtenen KO nicht beeinträchtigt. Durch Frameshifts im rekombinierten Allel kommt es zu einem frühzeitigen Stopp der Translation, so dass im homozygoten KO kein verkürztes PRG-1 Protein mit dem gegen den C-terminus (Exon 7) gerichteten Antikörper detektiert werden kann.

C.2 Phänotypisierung der PRG-1 Knockout Maus

C.2.1 *LacZ* Reporter als Marker der PRG-1 Expression

Bei der Generierung der PRG-1-KO Maus wurden genomischen Bereiche von Exon 4 bis Exon 7 durch eine IRES-LacZ-MC1neo Expressionskassette ersetzt (siehe C.1.1). Mittels dieses Inserts wurde nicht nur eine Deletion in der *prg-1* Sequenz erzielt, sondern auch die Möglichkeit geschaffen, die endogene PRG-1 Expression anhand der Translation des Reporterproteins β -Galactosidase vermittelt durch die virale „Internal ribosome entry site“ (IRES) zu verfolgen [103, 114]. Mittels einer einfachen Färbemethode, der X-Gal Färbung (siehe B.2.11.3), ließ sich die Expression von PRG-1 im Gehirn von heterozygoten Mäusen darstellen. Zum Vergleich wird in Abbildung 22 im Hippocampus die Expression von β -Galactosidase anhand einer X-Gal Färbung, die RNA Transkription von *prg-1* anhand einer DIG-Insitu Hybridisierung und die Proteinexpression von PRG-1 anhand einer DAB Immunfärbung dargestellt. Es wird erkennbar, dass die Transkription von *LacZ* und *prg-1* durch eine gemeinsame hippocampale Lokalisation übereinstimmt.



Abbildung 22. *LacZ* als Marker der PRG-1 Expression. Mittels des IRES-LacZ-MC1Neo Fragmentes in der PRG-1-KO Maus konnte die endogene PRG-1 Expression (hier im Hippocampus) analysiert werden. Die X-Gal Färbung (A), welche das Reaktionsprodukt der aktiven β -Galaktosidase (*lacZ*) in einer heterozygoten KO Maus darstellt, korreliert in der hippocampalen Lokalisation mit der DIG-insitu Hybridisierung für das *prg-1* Transkript einer WT Maus (B). Der PRG-1 Antikörper zeigt das PRG-1 Protein in den Dendriten der Körner- und Pyramidenzellen (C). (Maßstabsbalken (MB): 250 μ m).

Durch Fluoreszenzfärbungen mit einem β -Galactosidase (β -Gal) spezifischen Antikörper (siehe B.1.5) ließ sich nun die zellspezifische Expression von PRG-1 (β -Gal) im Vergleich mit anderen Zellmarkern analysieren. So konnte die ausschließlich neuronale Lokalisation von PRG-1 bestätigt werden. In Abbildung 23 ist eine Co-Färbung mit β -Gal und dem neuronalen nuklearen Marker NeuN [115] und dem Astrozytenmarker GFAP (Glial fibrillary acidic protein) im Hippocampus und Gyrus dentatus dargestellt. Es ist deutlich eine Kolokalisation zwischen β -Gal und NeuN zu erkennen. Zwischen GFAP und β -Gal ist keine Kolokalisation nachweisbar. Co-Färbungen mit anderen nicht neuronalen Markern wie Iba1 (Mikroglia) oder MBP (Oligodendrozyten) ergab ebenfalls keine Kolokalisation mit β -Gal (nicht gezeigt).

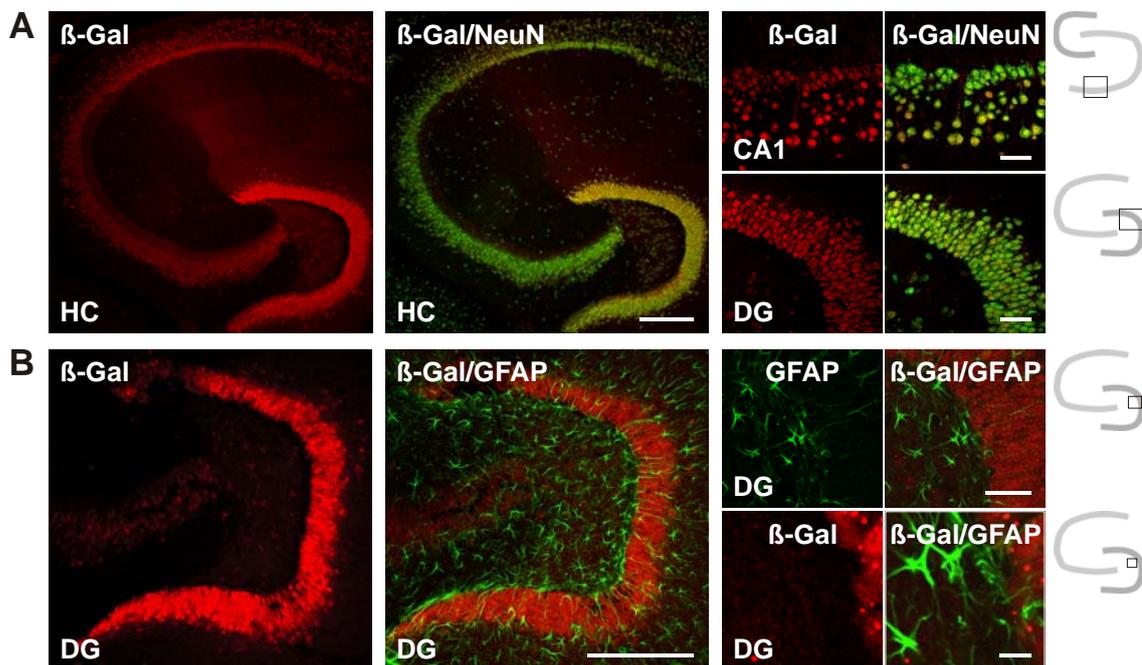


Abbildung 23. PRG-1 ist ein neuronal spezifisches Molekül. (A) β -Gal ist als Marker der endogenen PRG-1 Expression mit dem neuronalen Marker NeuN kolokalisiert (MB: 250 μ m links, 50 μ m rechts). (B) keine Kolokalisation mit dem astrocyten Marker GFAP (MB: 250 μ m links, 50 μ m rechts oben, 10 μ m rechts unten). (HC = Hippocampus, DG = Gyrus dentatus, CA1 = Cornu ammonis Area 1, Schema des Hippocampus symbolisiert Region der Aufnahme)

Um zu untersuchen, ob PRG-1 nur in einer spezifischen Population von Neuronen exprimiert wird, wurden verschiedene Co-färbungen mit β -Gal durchgeführt. So wurden Fluoreszenzfärbungen für Marker der GABAergen Interneurone, die die kalziumbindende Proteine Calbindin, Calretinin und Parvalbumin und das GABA produzierende Enzym GAD67 (glutamic acid decarboxylase) exprimieren, mit der heterozygoten β -Gal Expression im Hippocampus verglichen. In Abbildung 24 sind die Ergebnisse der Färbungen dargestellt. So konnte im Hippocampus keine Kolokalisation von β -Gal (PRG-1) mit diesen inhibitorischen GABAergen Interneuronen gefunden werden. PRG-1 ist dort lediglich auf erregenden, exzitatorischen glutamatergen Neuronen exprimiert. Um einen möglichen Einfluss des

untersuchten heterozygoten PRG-1 Knockouts auf die Entwicklung der einzelnen Neuronentypen auszuschließen, wurden neben diesen Fluoreszenzfärbungen auch DAB Färbungen der einzelnen Marker auf *prg-1* DIG-*in situ* Schnitten von WT Mäusen durchgeführt. Auch in diesem Ansatz konnte keine Kolokalisation von Zellen, die die *prg-1* RNA transkribierten, mit denen, die die Marker der GABAergen Interneuronen exprimierten, gefunden werden.

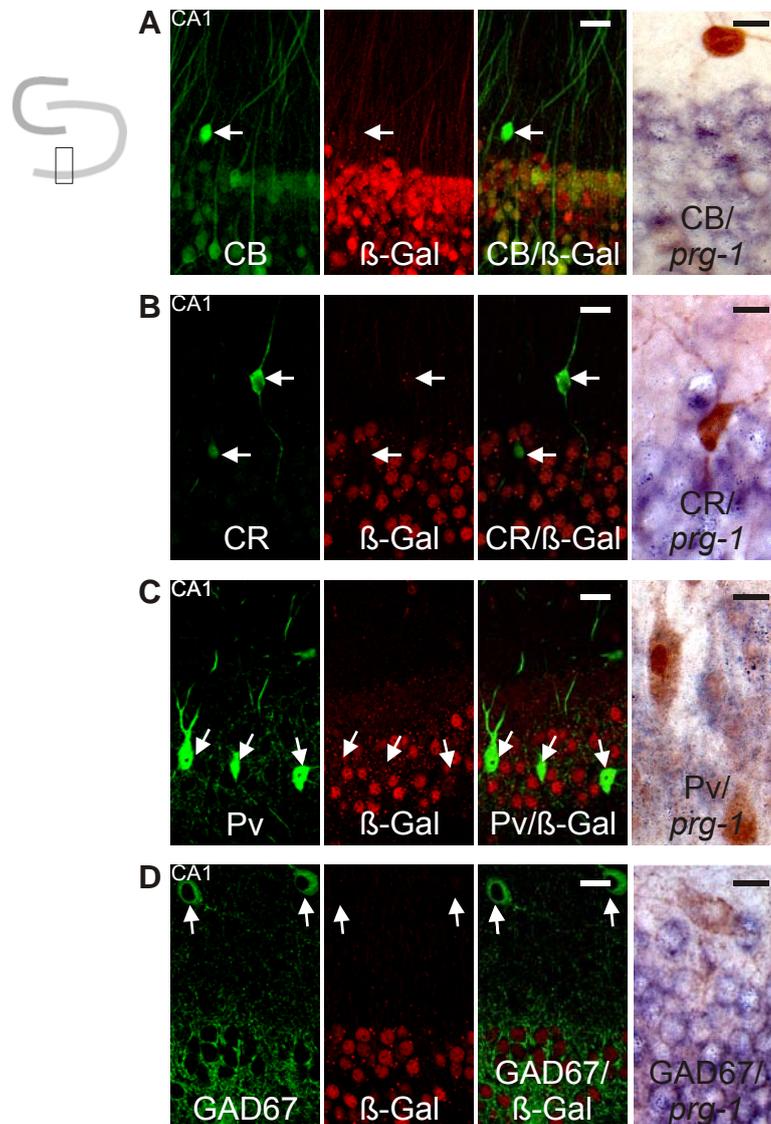


Abbildung 24. PRG-1 ist im Hippocampus selektiv auf erregenden glutamatergen Prinzipalneuronen exprimiert. Der Vergleich der Expression des β -Gal Reporters mit unterschiedlichen Markern der GABAergen Interneurone zeigt keine Kolokalisation im heterozygoten KO. Durch DIG-*in situ* Hybridisierung der *prg-1* mRNA und anschließende DAB Färbung der einzelnen Marker im WT konnte ebenfalls keine Kolokalisation festgestellt werden. **(A)** CB, Calbindin vs. (β -Gal / *prg-1*). **(B)** CR, Calretinin vs. (β -Gal / *prg-1*). **(C)** Pv, Parvalbumin vs. (β -Gal / *prg-1*). **(D)** GAD67 vs. (β -Gal / *prg-1*). (Pfeile zeigen auf nicht kolokalisierte Interneurone; Schema des Hippocampus symbolisiert Region der Aufnahme; MB: 20 μ m)

C.2.2 Beobachtungen zur PRG-1-KO Maus Linie

C.2.2.1 PRG-1-KO Mäusen besitzen erhöhte juvenile Sterberate

Während der Etablierung der PRG-1-KO Mauslinie musste festgestellt werden, dass eine reine KO Zucht wenig Nachkommen erbrachte. Bei ca. 15 angesetzten homozygoten Verpaarungen wurden in der Regel nach 2-3 Wochen nur ca. 1-2 Weibchen befruchtet. Daraufhin wurden homozygote KO Mäuse nur durch heterozygote Verpaarungen generiert. Es zeigte sich jedoch, dass auch hier die Anzahl an homozygoten KO Mäusen geringer war als erwartet. Bei einer heterozygoten Verpaarung hätten 50 % der Nachkommen einen heterozygoten Genotyp und jeweils 25 % der Nachkommen einen WT bzw. KO Genotyp zeigen müssen. Durch Vergleich der Anzahl an geborenen Tieren durch die tatsächliche Anzahl an Tieren, die nach ca. 3-4 Wochen von der Mutter abgesetzt und genotypisiert wurden, konnte festgestellt werden, dass mehr als die Hälfte der homozygoten KO Tiere innerhalb dieser ersten 3-4 Wochen gestorben sind (siehe Abbildung 25).

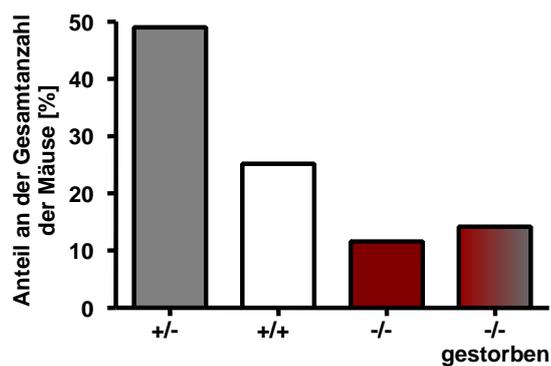


Abbildung 25. Erhöhte juvenile Sterberate der PRG-1-KO Mäuse. Bei einer heterozygoten Verpaarung wird eine Verteilung der Genotypen von 50 % +/-, 25 % +/+ und 25 % -/- erwartet. Durch Vergleich der Anzahl von geborenen Tieren mit der Anzahl an bei 3-4 Wochen genotypisierten Tieren wurde festgestellt, dass mehr als 50 % der -/- Tiere innerhalb dieser Zeit gestorben seien müssen (n (geborene Tiere) = 155).

C.2.2.2 PRG-1-KO Mäuse weisen Entwicklungsdefizite auf

Um diese hohen Todesraten homozygoter PRG-1-KO Mäuse verstehen zu können, wurden zunächst Mäuse aus heterozygoten Verpaarungen während ihrer Entwicklung über ihr Körpergewicht analysiert. Aus Abbildung 26 A wird erkennbar, dass homozygote PRG-1-KO Mäuse im Vergleich zu ihren WT Geschwistern bereits 9 Tage nach der Geburt signifikant geringere Körpergewichte besitzen (ANOVA mit Post hoc Bonferroni, $p < 0,001$, n (WT) = 43, n (KO) = 44). Abbildung 26 B zeigt die Unterschiede in der körperlichen Entwicklung bei P21 zwischen einer WT und einer KO Geschwistermaus. Erst im adulten Stadium konnten diese Unterschiede ausgeglichen werden. In Abbildung 26 C ist die Gewichtszunahme eines

Wurfes bestehend aus KO, WT und heterozygoten Mäusen dargestellt. Es fällt auf, dass der Anstieg der Gewichtszunahme bei WT und heterozygoten Mäuse tendenziell gleich groß ist. Der Anstieg in den homozygoten KO Tieren fällt ca. 15 Tage nach der Geburt leicht ab, geht nahe gegen 0 und steigt nach P22-23 wieder an, wobei diese Steigung der Gewichtszunahme der WT Mäuse entsprach. Eines der 3 KO Tiere zeigte eine starke Gewichtsreduktion bei P17. Es starb mit nur 3,1 g bei P22. In Abbildung 26 D ist weiterhin erkennbar, dass trotz des Angleichens des Körpergewichtes im adulten Tier die Gehirngewichte perfundierter KO Mäuse signifikant geringer waren als die ihrer WT Geschwistertiere (t-Test, $p < 0,05$, n (WT) = 21, n (KO) = 22).

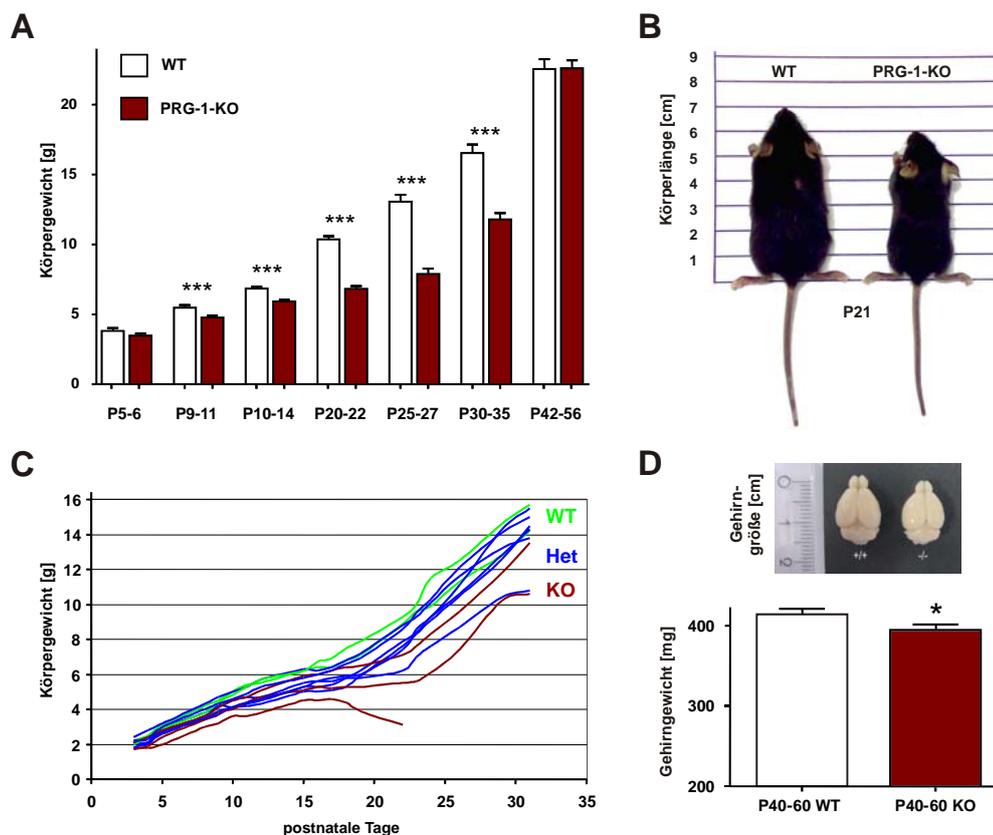


Abbildung 26. Entwicklungsdefizite der PRG-1-KO Mäuse. **(A)** Gewichtsmessungen ergaben, dass sich die Körpergewichte bereits ab P9 zwischen KO und WT signifikant unterschieden. Adulte Mäuse wiesen keine Unterschiede mehr auf. **(B)** Beispiel des körperlichen Unterschiedes zwischen einer KO Maus gegenüber der Geschwister WT Maus bei P21. **(C)** Gewichtszunahme innerhalb eines heterozygot verpaarten Wurfes. Im KO Tier ist der Anstieg der Gewichtszunahme zwischen dem 15. und 22. Tag der Geburt geringer als bei den WT Geschwistertieren. **(D)** Geringeres Gehirngewicht in adulten KO Tieren. Trotz gleichen Körpergewichtes unterschieden sich die Gehirngewichte adulter Geschwistertiere signifikant.

C.2.2.3 PRG-1-KO Mäuse zeigen spontane Anfälle

Um die Ursache für diese insgesamt verringerten Körpergewichte und den frühen Todeszeitpunkt der Hälfte der KO Tiere im juvenilen Stadium zu ergründen, wurden Mäuse

aus heterozygoten Verpaarungen zwischen P17 und P24 durch Beobachtung ihres Verhaltens genauer untersucht. Dabei konnten homozygote KO Mäuse bei P21 beobachtet werden, die einen spontanen Anfall entwickelten. In Abbildung 27 A sind Bilder eines solchen spontanen Anfalls dargestellt. Der Anfall wurde erkennbar durch das einleitende komplette Erstarren des Tieres. Anschließend wurden rhythmische Zuckungen beider Vorder- und Hinterpfoten (tonisch-klonischer Anfall; Bild Links), das sich mit dem Nesteln der Vibrissen (Bild Mitte) abwechselte, beobachtet. Daraufhin folgte eine über dem gesamten Körper hinweg krampfhaft Anspannung der Muskulatur (tonischer Anfall; Bild Rechts), der nach ca. 10-15 min aufhörte. Die Maus war anschließend im Rahmen der postictalen Phase durch starke Erschöpfung für weitere 30 min regungslos.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dietmar Schmitz (Charité, Neurowissenschaftliches Forschungszentrum, NWFZ) eingegangen, der die Möglichkeit besaß, zusammen mit Dr. Sebastian Schuchmann, *in vivo* elektroenzephalografische Messungen (EEG) an den PRG-1-KO Mäusen durchzuführen, um die beobachteten Anfälle besser zu charakterisieren.

So wurden für solche *in vivo* EEG Messungen intracraniale, epidurale Elektroden über dem somatosensorischen Kortex in KO und WT Mäusen zwischen P19 und P31 implantiert. In allen untersuchten PRG-1-KO Mäusen ($n = 10$), jedoch nicht in den WT Geschwistertieren, wurden hypersynchrone Aktivitäten und prä-ictale Ereignisse durch schnelle Feldpotentialveränderungen ($>150 \mu\text{V}$) um P20 beobachtet. In 5 von 10 KO Tieren wurden elektrographisch ictale Ereignisse und generalisiert tonisch-klonische Anfällen während der 2 folgenden Tage beobachtet (siehe Abbildung 27 B-D). Die Frequenz der Feldpotentialentladungen war 3 bis 5 Hz während ictaler und 0,8 bis 1,6 Hz während interictaler Aktivität (siehe Abbildung 27 C). Die Dauer der ictalen Aktivität betrug einige Minuten bis Stunden. Alle gemessenen KO Mäuse, mit Nachweis solcher elektrographischen Aktivität, verstarben während des Status epilepticus (ictale Aktivität > 10 min).

Weiterhin wurden KO Mäuse analysiert, bei denen die Elektroden auf beiden Hemisphären implantiert wurden. So konnten prä-ictale Aktivitäten nur auf einer Hemisphäre und ictale Aktivitäten auf beiden Hemisphären aufgezeichnet werden ($n(\text{KO}) = 4$, $n(\text{WT}) = 3$; siehe Abbildung 27 D). Dies lässt vermuten, dass es sich bei den beschriebenen Anfällen um fokale (partielle) Anfallsgeschehen mit anschließender sekundärer Generalisierung handelt. Interessanterweise gab es einige KO Mäuse, bei denen nur hypersynchrone Aktivitäten und keine ictalen Ereignisse zu erkennen waren ($n = 3$). Bei diesen Tieren normalisierte sich die elektrographische Messung nach dem Wegfall der schnellen Feldpotentialveränderung bei P22 (siehe Abbildung 27 E).

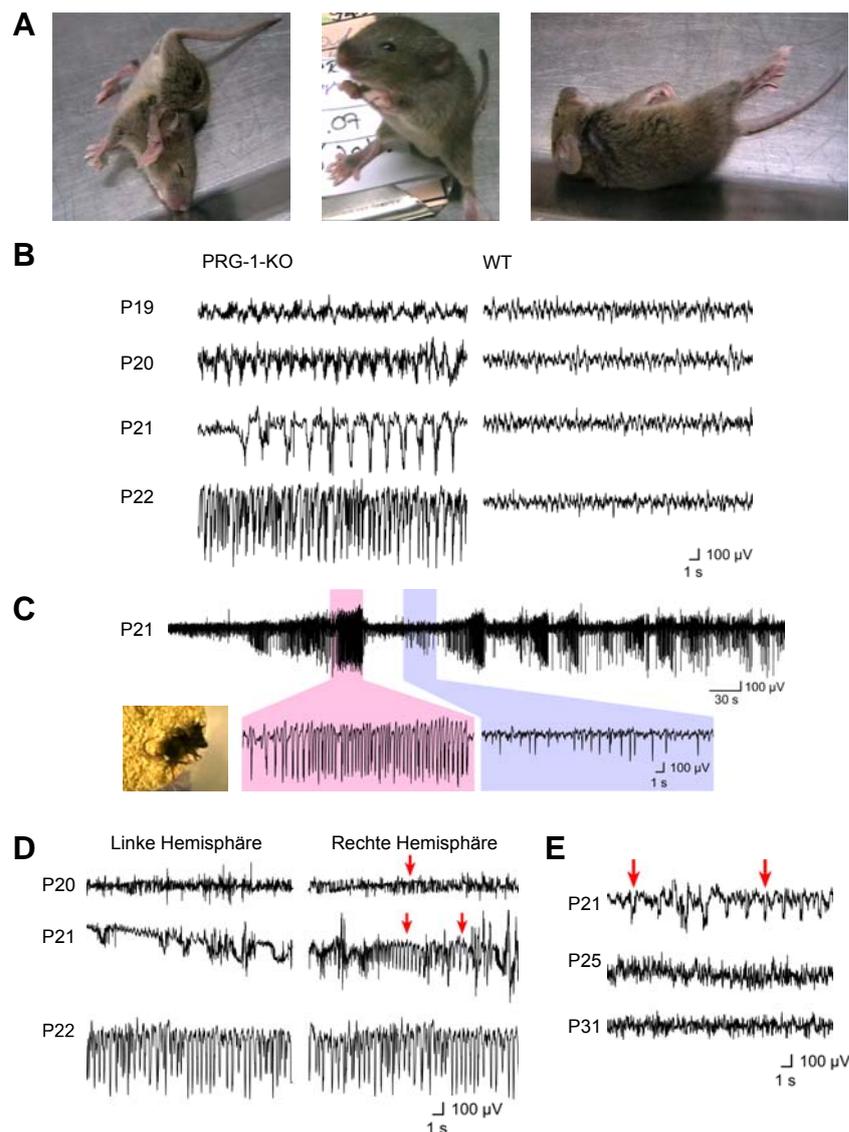


Abbildung 27. EEG Messungen bei homozygoten PRG-1-KO Mäusen. **(A)** Beobachtung eines spontanen Anfalles. Links: typisches tonisch-klonisches Verhalten, erkennbar durch rhythmisches Zucken der Vorder- und Hinterpfoten. Mitte: Aufrichten und mehrmaliges starkes Nesteln der Vibrissen. Rechts: tonischer Anfall, erkennbar durch krampfhaft, langanhaltende Anspannung der Muskulatur. **(B)** Prä-ictale Anfälle bei P20/21 und ictale Aktivität bei P22 KO Tieren während *in vivo* EEG Messungen (Links KO, Rechts WT Geschwistertier). **(C)** Ictale (rote Markierung) und interictale (blaue Markierung) Aktivität während *in vivo* EEG Messungen einer P21 PRG-1-KO Maus. Bild zeigt eine Maus im Status epilepticus während der Messung. **(D)** *In vivo* Messungen einer PRG-1-KO Maus mit Elektroden auf beiden Hemisphären bei P20-P22. Hypersynchrone Aktivität und prä-ictale Ereignisse können auf der rechten Hemisphäre (siehe Pfeile) bei P20/21 identifiziert werden. Generalisierte ictale Aktivität ist bei P22 über beiden Hemisphären erkennbar. **(E)** *In vivo* Messungen einer PRG-1-KO Maus zwischen P21-P31. Diese Maus entwickelte keine verhaltensauffälligen Anfälle, jedoch zeigte hypersynchrone Aktivität bei P21 (siehe Pfeil), welche über die folgenden Tage verschwand.

C.2.2.4 Adulte PRG-1-KO Mäuse besitzen eine erhöhte Anfällsbereitschaft nach Kainat-Injektionen

Da die beobachteten Anfälle alle in juvenilen Stadien um P21 auftraten, sollte auch untersucht werden, ob adulte PRG-1 defizienten und heterozygot defiziente Mäuse eine generelle höhere Erregbarkeit auf das Glutamat-Analoga Kainat (KA) im Vergleich zu WT Mäuse besitzen. Dazu wurden KA intraperitoneal 10-12 Wochen alten, männlichen Mäusen verabreicht, um spontane Anfälle zu induzieren (Methode siehe B.2.12.1). In Abbildung 28 sind die Ergebnisse dieser Experimente dargestellt. Es zeigte sich, dass adulte PRG-1-KO Tiere, obwohl sie in diesem Alter keine spontanen Anfälle zeigten, eine signifikant höhere Anfällsbereitschaft auf KA besitzen als WT Tiere. Interessanterweise wiesen heterozygote Tiere ebenfalls eine höhere Anfällsbereitschaft auf mit Werten, die zwischen WT und KO lagen.

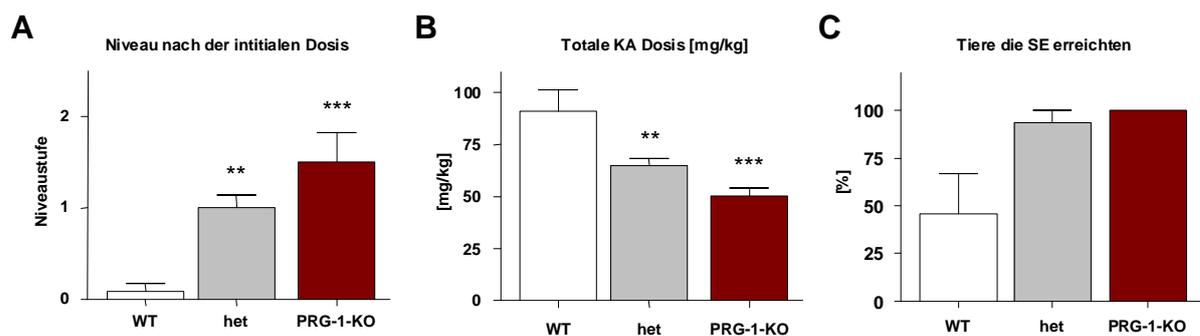


Abbildung 28. Adulte PRG-1-KO Mäuse und heterozygote PRG-1-KO Mäuse besitzen eine signifikant höhere Anfällsbereitschaft für Kainat-induzierte Anfälle als WT Geschwistertiere. **(A)** Bereits nach der initialen Dosis und noch vor der ersten ergänzenden Injektion zeigten heterozygote und homozygote PRG-1-KO Tiere ein höheres Anfallsniveau (WT = $0,09 \pm 0,09$, het = $1,0 \pm 0,14$, KO = $1,5 \pm 0,3$). **(B)** Um Niveau 5 (Status epilepticus, SE) zu erreichen war die Gesamtmenge an injizierten KA in heterozygoten und homozygoten PRG-1-KO signifikant geringer als in WT Tieren (WT = $90,86 \pm 10,52$, het = $65,04 \pm 3,4$, KO = $50,29 \pm 3,99$ mg/kg KW). **(C)** Tiere die SE während des 4 stündigen Experiments erreichten (WT = $45,7 \pm 20,8$ %, het = $93,74 \pm 6,2$ %, KO = 100%). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ANOVA mit post hoc Bonferroni, n (WT) = 11, n (Het) = 24, n (KO) = 14).

C.2.3 Morphologischen Veränderungen in PRG-1-KO Mäusen

Aufgrund der beobachteten spontanen Anfälle bei juvenilen Mäusen wurden morphologische Analysen der WT und PRG-1-KO Mäuse bei P21, dem Beginn der konvulsiven Aktivität, unternommen. Durch DAB-Färbungen mit dem neuronalen Marker NeuN auf perfundierten horizontalen Gehirnschnitten konnten keine Veränderungen in der Entwicklung und Verteilung der Neuronenpopulationen bei P21 festgestellt werden. In Abbildung 29 A sind die Ergebnisse der NeuN Färbungen auf hippocampalen Pyramidenzellen der CA1 Region dargestellt. Auch die Verteilung der inhibitorischen GABAergen Interneurone, die Parvalbumin exprimieren [116], wurde durch DAB-Färbungen dargestellt (siehe Abbildung 29 B). Auch hier konnte keine Veränderung in der Verteilung der Zellen in der CA1 Region festgestellt werden.

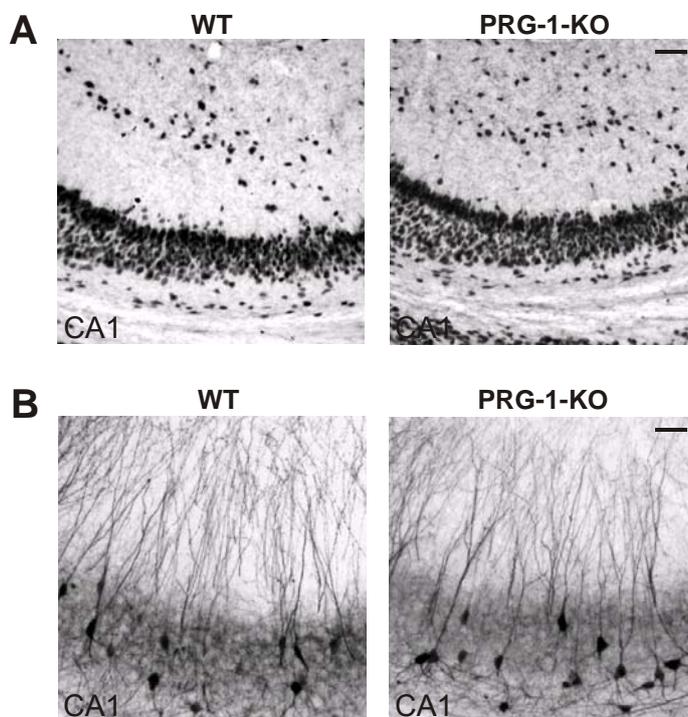


Abbildung 29. Keine Veränderungen in der Entwicklung von Neuronen und Interneuronen in PRG-1-KO Mäusen bei P21. (A) NeuN-DAB Färbungen zeigen keine Unterschiede in der Entwicklung der hippocampalen Pyramidenzellen der CA1 Region (MB: 100 μ m) (B) Parvalbumin-DAB Färbungen zeigen ebenfalls, dass die Entwicklung der inhibitorischen Interneurone zwischen KO und WT bei P21 unverändert ist (MB: 50 μ m). Schema des Hippocampus illustriert die Lage der mikroskopischen Aufnahme (CA1 Region).

Während in juvenilen Mäusen keine morphologischen Unterschiede erkennbar waren, wurden in adulten Mäusen (2-4 Monate alt) typische postkonvulsive Veränderungen, wie hippocampale Sklerose, Moosfasersprouting und astrozytäre Gliose [117-121], nachgewiesen. Durch die TIMM Färbung konnte so aberrierendes Moosfaserwachstum, durch Hineinwachsen der Moosfasern in die Molekularschicht des Gyrus Dentatus und durch

ein längeres infrapyramidales Moosfaserband in der PRG-1-KO Maus gezeigt werden (siehe Abbildung 30 A). Gliale Veränderungen (Gliose) wurden durch Immunfärbungen gegen den Astrozytenmarker GFAP und den Mikrogliamarker Iba1 untersucht. Es zeigte sich, dass die Anzahl an GFAP und Iba1 positiven Zellen in dem postkonvulsiven PRG-1-KO Maus erhöht ist (siehe Abbildung 30 B). Weiterhin konnte eine für postkonvulsive Tiere typische [121] erhöhte Expression des Neuropeptids Y (NPY) in den Moosfasern verbunden mit einer Verringerung der Anzahl NPY positiver Interneurone und GluR2 positiver hilären Neurone gezeigt werden (siehe Abbildung 30 C+D).

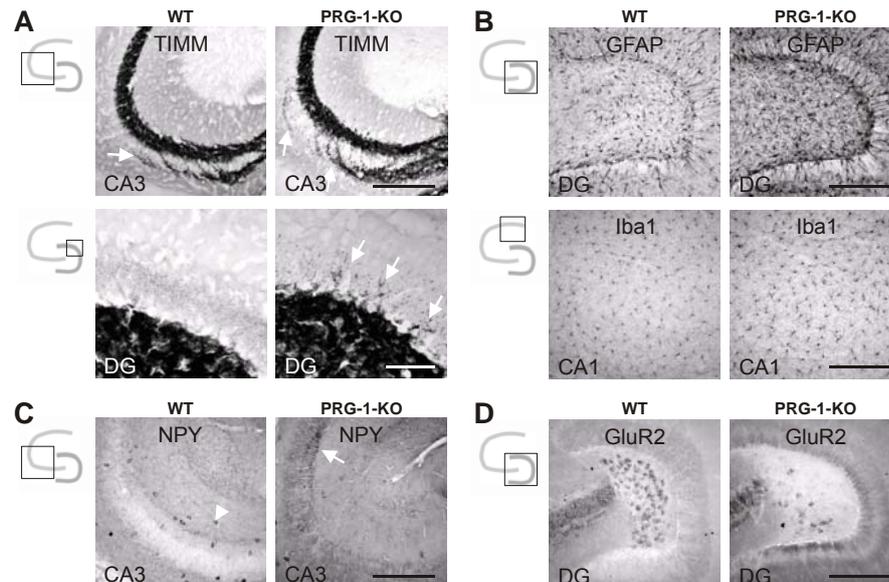


Abbildung 30. Postkonvulsive Veränderungen in adulten PRG-1-KO Mäusen. **(A)** TIMM Färbung zeigt aberrierendes Moosfasernwachstum. Oben: längeres infrapyramidales Moosfaserband in PRG-1-KO Mäusen (siehe Pfeile; MB 250 μ m). Unten: Einwachsen hilärer Moosfasern in die Molekularschicht des DG in PRG-1-KO Mäusen (siehe Pfeile; MB: 100 μ m). **(B)** Erhöhte Anzahl GFAP- und Iba1-positiver Zellen in PRG-1-KO Mäusen (Gliose) (MB: 250 μ m). **(C)** Erhöhte Expression von NPY in den Moosfasern (Pfeil) und verringerte Anzahl NPY positiver Interneurone (Pfeilkopf) in PRG-1-KO Mäusen (MB: 250 μ m). **(D)** Verringerung GluR2 positiver hilärer Neurone in der PRG-1-KO Maus (MB: 250 μ m). Die schematische Darstellung des Hippocampus zeigt die Lage der mikroskopischen Aufnahme.

C.2.4 CA1 Pyramidenzellen von PRG-1-KO Mäusen sind übererregbar

Aufgrund der beobachteten konvulsiven Aktivitäten und der unveränderten Entwicklung und Expression der morphologischen Marker bei ca. P21 wurden, durch eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dietmar Schmitz (Charité, Neurowissenschaftliches Forschungszentrum, NWFZ), die PRG-1-KO Mäuse in diesem Alter mit der Hilfe von M.Sc. Prateep Beed an ihren hippocampalen CA1 Pyramiden Neurone näher elektrophysiologisch charakterisiert.

So wurde bei hippocampalen Schnitten in einer sogenannten „Input-output“ Kurve, die durch die Analyse des Anstieges der Feldpotentiale (fEPSPs - Feld-exzitatorisches post-synaptisches Potential) nach unterschiedlichen Anregungen (fiber volley) der Schaffer-Kollateralen im Stratum Radiatum erhalten wurde, gezeigt, dass die homozygoten KO Schnitte im Vergleich zu WT Geschwistertieren signifikant übererregbar sind (in allen Messpunkten $p < 0,05$, t-test, siehe Abbildung 31 A). Interessanterweise zeigten heterozygote hippocampale Schnitte, bei denen die Proteinexpression von PRG-1 ungefähr 50 % der der WT Tiere beträgt (siehe Abbildung 20 C), fEPSP Anstiege, die zwischen den KO und WT Werten lagen (siehe Abbildung 31 A). Trotz dieser Unterschiede in ihrer Erregbarkeit zeigte die Untersuchung der intrinsischen Eigenschaften der CA1 Pyramidenzellen keine Auffälligkeiten zwischen den WT und KO Zellen. So zeigten das Ruhemembranpotential, der Eingangswiderstand und die Aktionspotentialamplitude keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 31 B).

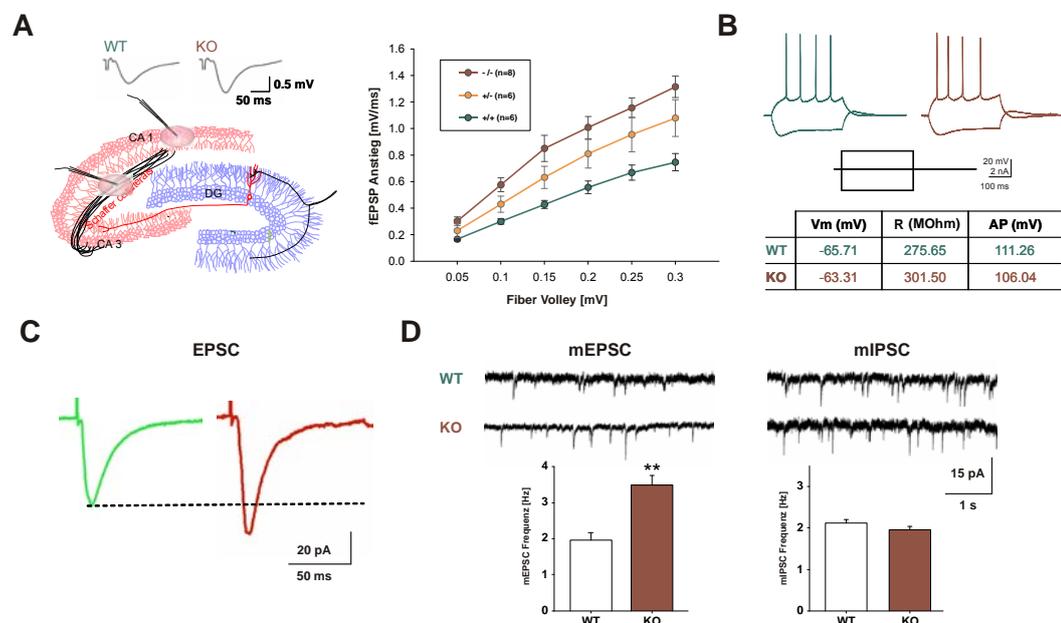


Abbildung 31. CA1 Neurone sind übererregbar in PRG-1-KO Mäusen. **(A)** Schema der extrazelluläre Feldpotentialmessung (fEPSPs) evoziert durch elektrische Stimulation der Schaffer-Kollateralen (links). Der Anstieg der fEPSP bei verschiedenen Anregungsintensitäten (Fiber Volley) ist für WT, heterozygot und KO dargestellt (rechts). Erhöhte Erregbarkeit ist im PRG-1-KO (rot) im Vergleich zum WT (grün) erkennbar. Der heterozygote KO (orange), mit der halben Gen- als auch Proteindosis (siehe Abbildung 20 C), zeigt Werte die zwischen KO und WT liegen. **(B)** Intrinsische Eigenschaften der CA1 Pyramidenzellen sind zwischen WT und PRG-1-KO nicht verschieden. **(C)** Evozierte synaptische glutamaterge Ströme sind in der PRG-1-KO Maus (rot) erhöht. **(D)** Eine signifikant höhere mEPSC Frequenz wurde in PRG-1-KO CA1 Pyramidenzellen im Vergleich zur WT Zelle beobachtet. Die Frequenz der mIPSCs ist nicht signifikant unterschiedlich.

Um zu untersuchen, ob die Veränderungen der neuronalen Erregbarkeit auch auf Einzelzellebene messbar sind, wurden synaptische Ströme und Miniaturereignisse wie mEPSCs (exzitatorischer postsynaptischer Strom) und mIPSCs (inhibitorischer postsynaptischer Strom) von CA1 Pyramidenzellen untersucht. Der Vergleich der synaptischen glutamatergen Ströme zwischen WT und KO Zellen bei gleicher Stimulationsintensität und Position der Stimulationselektroden zeigt einen größeren synaptischen Strom bei PRG-1-KO Mäusen (siehe Abbildung 31 C). Durch das Messen der spontanen Vesikelfreisetzung an glutamatergen Synapsen, der mEPSC Messung, konnte festgestellt werden, dass die CA1 Pyramidenzellen der PRG-1-KO Mäuse signifikant höhere mEPSC Frequenzen besitzen als ihre WT Geschwistertiere (t-Test, $p < 0.01$, KO: $n = 8$, $3,48 \pm 0.22$ Hz; WT: $n = 8$, $1,96 \pm 0.26$ Hz, siehe Abbildung 31 D). Es zeigte sich, dass dieser Effekt spezifisch für die exzitatorische Transmission auf Pyramidenzellen ist, da die inhibitorischen IPSCs in ihrer Frequenz keine signifikanten Veränderungen zeigen (t-Test, $p = 0,13$, KO: $n = 4$, $1,96 \pm 0.07$ Hz; WT: $n = 4$, 2.13 ± 0.08 Hz; siehe Abbildung 31 D).

C.2.5 Keine offensichtlichen Unterschiede in der Expression der Marker der synaptischen Maschinerie.

Da die zelluläre „grobmorphologische“ Analyse keine Unterschiede zwischen KO und WT erkennen ließ, wurden, im Hinblick auf die veränderte synaptische Transmission in den übererregbareren KO Mäusen, die Expressionen von prä- und postsynaptischen Markern bei P21 untersucht. So wurden die vesikulären Glutamat- (VGlu1) und GABA- (VGat) Transporter, das GABA produzierende Enzym GAD67, die AMPA Rezeptor Untereinheiten GluR1, GluR2/3, GluR4 und die NMDA Rezeptor Untereinheit NR1, sowie der Synapsenmarker Synaptophysin (Syn) durch Fluoreszenzfärbungen in ihrer Expression in WT und PRG-1-KO Geschwistertieren untersucht. In Abbildung 32 sind die konfokalen Aufnahmen der CA1 Region der einzelnen Marker zwischen KO und WT gegenübergestellt. Auch hier konnten keine Unterschiede in der Expression dieser Marker festgestellt werden.

Um dieses Ergebnis noch weiter zu festigen, wurden Synaptosomenpräparationen von Gesamthirnhomogenaten von WT und PRG-1-KO Geschwistertieren bei P21 durchgeführt. Die Expression der einzelnen Marker wurden per Western Blot analysiert und anschließend durch Vergleich mit dem Standard Synaptophysin quantifiziert. In Abbildung 33 ist das Ergebnis dieser Analysen dargestellt. Die Expression der untersuchten Proteine VGlu1, VGat, PSD95, GluR1, GluR2/3 und NR1 ist zwischen KO und WT unverändert (t-Test, $p > 0,5$, n (WT) = 8, n (KO) = 8).

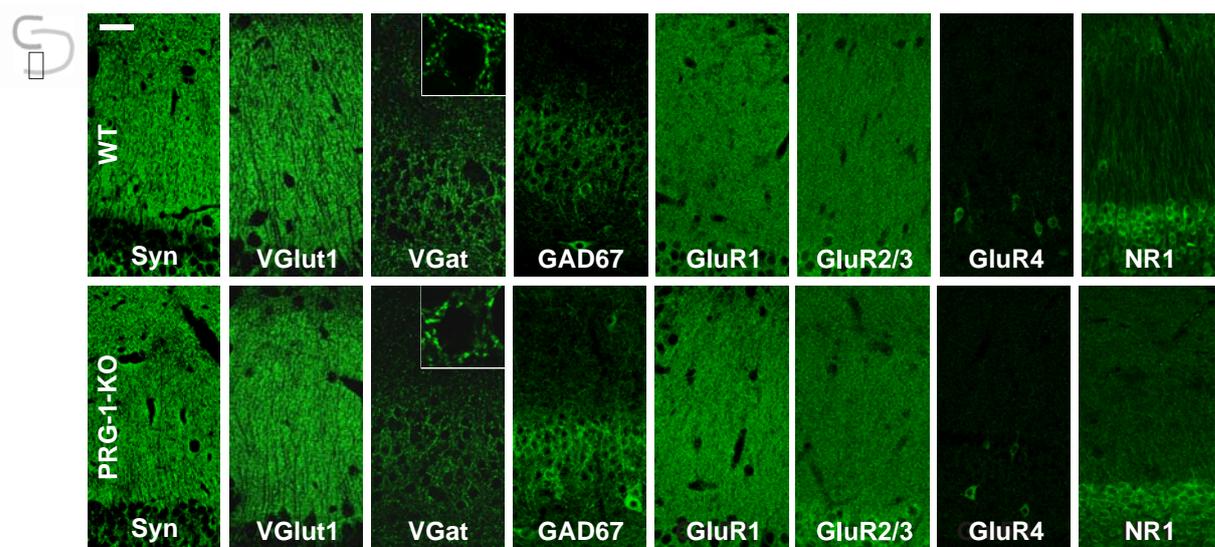


Abbildung 32. Fluoreszenzfärbungen von prä- und postsynaptischen Markern in der hippocampalen CA1 Region bei P21. Es konnten keine Unterschiede zwischen WT und PRG-1-KO Geschwistertieren in der Expression dieser Marker festgestellt werden. Schema des Hippocampus links illustriert die Lage der mikroskopischen Aufnahme. MB: 50 μ m.

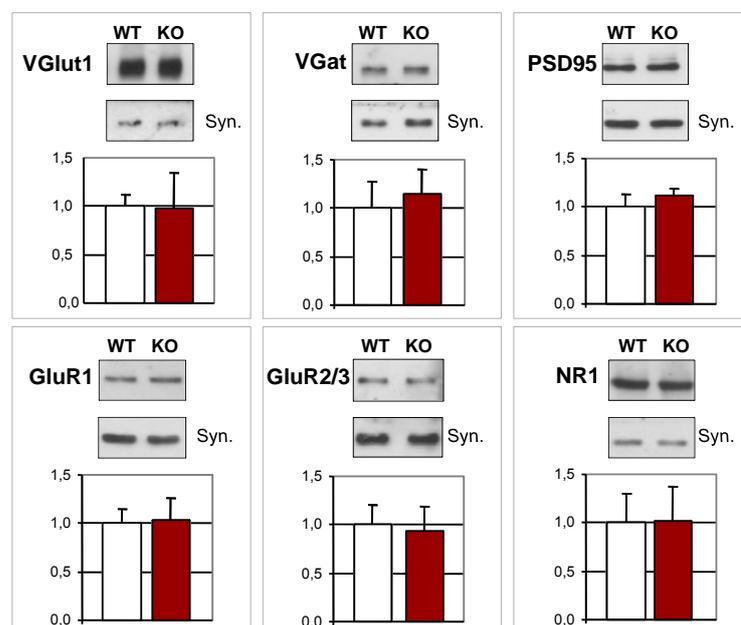


Abbildung 33. Western Blot Analysen der Expression von prä- und postsynaptischen Markern von Synaptosomenpräparationen bei P21. Die Quantifizierung der Expression der einzelnen Marker im Vergleich zum Standard Synaptophysin (Syn) ergab keine signifikanten Unterschiede (weiß = WT, rot = KO).

C.2.6 Komplementierung des Phänotyps und Einzelzell-KO durch *in utero* Elektroporation

Um 1. den beobachteten Phänotyp auf die Übererregbarkeit der einzelnen CA1 Zelle zurückführen zu können, und 2. eventuell mögliche Unterschiede in der Entwicklung des neuronalen Netzwerkes in den KO Mäusen auszuschließen und 3. mögliche post/prä-Synaptische Effekte zu untersuchen, sollte *prg-1* / PRG-1 nur in einer Teilpopulation von CA1 Pyramidenzellen in den konstitutiven PRG-1-KO Mäusen exprimiert bzw. in den konditionellen PRG-1-cKO Mäusen deletiert werden. Anschließend sollten einzelne CA1 Zellen elektrophysiologisch charakterisiert werden (AG Prof. Schmitz). Hierzu wurde die Methode der *in utero* Elektroporation (IUE) (Methode siehe B.2.12.2) eingesetzt, die von Jan Baumgart in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Nitsch (Charite, Institut für Zell und Neurobiologie) durchgeführt wurde [108, 122].

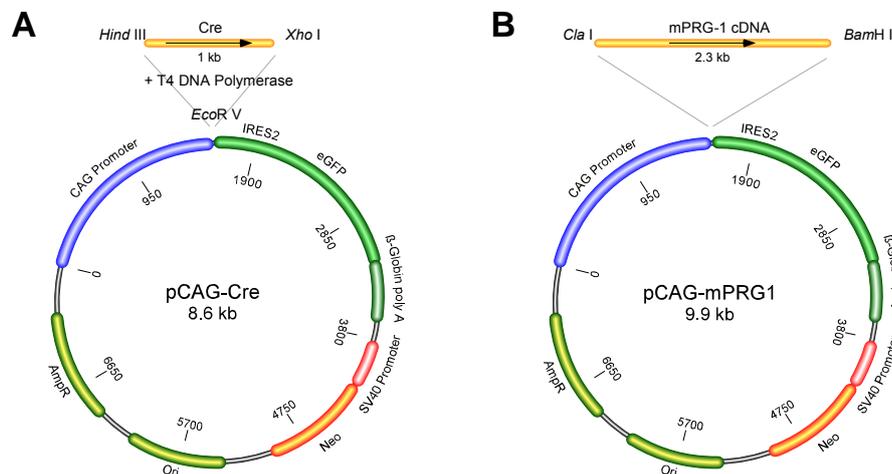


Abbildung 34. Klonierung der *in utero* Elektroporationsvektoren. (A) Um pCAG-Cre zu generieren, wurde ein Hind III / Xho I Cre-Expressionsfragment, welches durch die T4 DNA Polymerase aufgefüllt wurde, in linearisierten (*EcoRV*) pCAG-IRES-GFP kloniert. (B) pCAG-mPRG1 wurde durch die Klonierung von mPRG-1 cDNA über Cla I / BamHI in pCAG-IRES-GFP hergestellt.

Zunächst mussten hierfür die *in utero* Expressionsplasmide hergestellt werden. Als Ausgangsplasmid diente ein pCAG-IRES-GFP Vektor, der mittels des CAG Promotors [123] eine effektive Expression in dem *in utero* Elektroporationssystem ermöglicht [124] und gleichzeitig, durch die enthaltene IRES-GFP Expressionskassette, die Expression des Inserts in den elektroporierten Zellen durch GFP Expression nachvollziehen lässt [104, 114]. Um PRG-1 nur in einer Teilpopulation an Zellen zu deletieren, musste der pCAG-IRES-GFP Vektor die Cre-Rekombinase in PRG-1-cKO Mäusen exprimieren. Dazu wurde der pCAG-IRES-GFP Vektor über *EcoRV* linearisiert und ein durch die T4 DNA Polymerase aufgefülltes *Hind III* / *Xho I* Restriktionsfragment, welches die Cre-Expressionskassette

enthielt (von Dr. Hagen Wende, Max-Delbrück-Centrum, Berlin Buch), inseriert, um den Vektor pCAG-Cre zu bilden (siehe Abbildung 34 A). Für die Expression von PRG-1 in den PRG-1-KO Mäusen wurde zunächst cDNA aus Gehirn-mRNA von adulten Mäusen hergestellt (siehe B.2.3.5), das *prg-1* Transkript über PCR mit den angefügten Restriktionsschnittstellen für *Cla*I und *Bam*H I amplifiziert (Primer siehe B.1.7.9), in TA Kloning Vektoren rekombiniert und anschließend über *Cla*I / *Bam*H I Restriktionsverdau in pCAG kloniert, um den Vektor pCAG-mPRG1 zu bilden (siehe Abbildung 34 B).

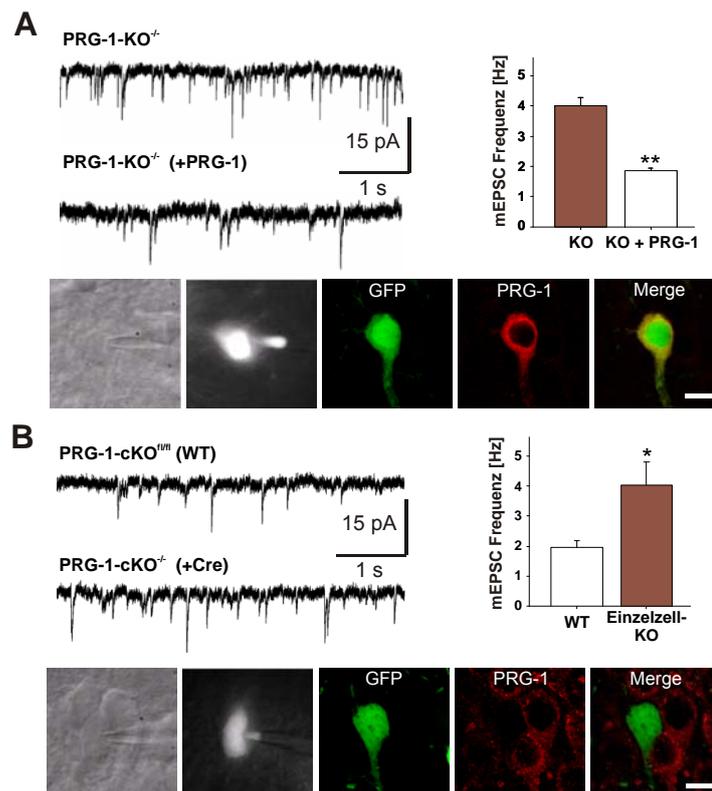


Abbildung 35. PRG-1 Überexpression und PRG-1 Einzelzell-knockout durch IUE. **(A)** IUE von pCAG-mPRG1 in PRG-1-KO Mäusen führt zur signifikanten Erniedrigung der mEPSC Frequenz in PRG-1 überexprimierenden, GFP positiven CA1 Neuronen im Vergleich zu den umgebenden, GFP neg., KO Neuronen. Untere Bilder zeigen das Patchen der Zellen und eine Färbung der GFP pos., PRG-1 überexprimierenden Zelle. **(B)** IUE von pCAG-Cre in homozygot konditionellen KO Mäusen (PRG-1-cKO) führt zur signifikanten Erhöhung der mEPSC Frequenz in PRG-1 -/- und GFP⁺ CA-1 Neuronen. Untere Bilder zeigen das Patchen der GFP neg. bzw. pos. CA-1 Neurone und eine Färbung der GFP pos., PRG-1 -/- Zelle. MB: 15 µm

Die IUE von *prg-1* mittels des pCAG-mPRG1 Vektors in PRG-1-KO Mäuse wurde durchgeführt, um zu analysieren, ob eine Expression von PRG-1 in einzelnen Neuronen zu einer Normalisierung des pathophysiologischen Phänotyps führen würde. Die Elektroporation erfolgte am Embryonaltag E15. Am postnatalen Tag P21 wurden spontane Transmissionen (miniatur EPSPs) von CA1 Pyramidenzellen in hippocampalen Schnitten gemessen. Dabei konnte im selben Schnitt neben einer PRG-1-KO Zelle (GFP negativ) auch eine grün

fluoreszierende (GFP positiv), PRG-1 überexprimierende, Zelle gemessen werden. Es zeigt sich, dass im gleichen Schnitt die GFP positiven, PRG-1 exprimierenden Zellen eine signifikant niedrigere, dem WT ähnliche, mEPSC Frequenz besaßen als GFP negative KO Zellen (t-Test, $p < 0,01$, KO/GFP⁻: $n = 4$, $4,01 \pm 0,29$ Hz; PRG-1 pos. / GFP⁺: $n = 5$, $1,87 \pm 0,08$ Hz; siehe Abbildung 35 A).

Für die Deletion von PRG-1 erfolgte die Elektroporation von pCAG-Cre in homozygoten E15 PRG-1-cKO Mäusen. Die PRG-1 defiziente P21 CA1 Pyramidenzelle besaß im Vergleich mit der WT, GFP negativen Zelle, eine signifikant höhere mEPSP Frequenz (t-Test, $p < 0,05$, KO: $n = 7$, 4.02 ± 0.78 Hz; WT: $n = 4$, 1.96 ± 0.23 Hz; siehe Abbildung 35 B).

C.2.7 Untersuchungen zur modulatorischen Funktion von PRG-1 auf die LPA Signaltransduktion mittels der PRG-1-KO Maus

C.2.7.1 Geringere Lipid Aufnahme in primären Neuronen von PRG-1-KO Mäusen

Um die möglichen Auswirkungen auf die modulatorische Funktion von PRG-1 auf die LPA Signaltransduktion mittels der PRG-1-KO Maus zu untersuchen, wurden Aufnahmeexperimente mit dem fluoreszierenden PA Analoga PA-NBD in ähnlicher Weise durchgeführt, wie bereits durch Renaults et al. in Experimenten mit dem Drosophila LPP *wun2* beschrieben [100]. Dazu wurden primäre Neurone von WT und PRG-1-KO Embryos präpariert und nach 7 Tagen in Kultur mit NBD-PA versetzt (Methode siehe B.2.10.2). Fixierte Zellen wurden anschließend bei gleichen Anregungsparametern mittels eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops (Leica SL) und der Software ImageJ auf ihre Fluoreszenzintensität untersucht. Als Ergebnis dessen, konnte gezeigt werden, dass die PRG-1-KO Neurone ($n = 38$) eine um ca. 50 % signifikant niedrigere Fluoreszenz aufwiesen, als die WT Geschwister Neurone ($n = 30$, t-test, $p < 0,001$, siehe Abbildung 36).

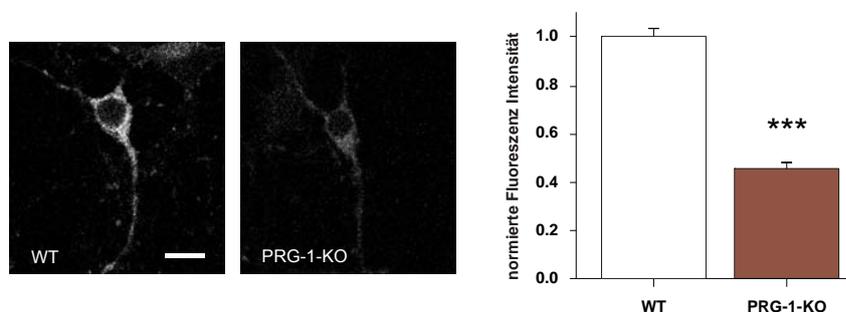


Abbildung 36. NBD-PA Aufnahmeexperiment an primären neuronalen Zellkulturen. Die Fluoreszenzintensität der PRG-1-KO Neurone ist um ca. 50 % signifikant niedriger als die Fluoreszenzen von WT Neuronen. MB: 10 μ m.

C.2.7.2 *In utero* Elektroporation eines mutierten PRG-1 Proteins zeigt keine Normalisierung der mEPSC Frequenz

Durch die festgestellte Normalisierung der mEPSC Frequenz bei der Überexpression von PRG-1 in PRG-1-KO Zellen war es nun möglich, die modulatorische Funktion von PRG-1 auf die LPA Signaltransduktion im Hinblick auf die synaptische Transmission zu analysieren. Da bereits gezeigt wurde, dass eine Punktmutation an einem kritischen extrazellulären Motiv (Histidin zu Lysin in Domäne 2) bei Lipid-Phosphat-Phosphatasen zu einer Störung der Interaktion mit Lipid Phosphaten im extrazellulärem Raum führt [7, 99], und da Bräuer et al. [1] ebenfalls gezeigt hatten, dass diese Mutation, wenn sie in PRG-1 eingeführt wurde (H253K), zu keinem Schutz vor der durch LPA induzierten Neuritenretraktion führt, sollte PRG-1 an diesem kritischen extrazellulären Motiv erneut mutiert werden und durch *in utero* Elektroporation in KO Mäuse exprimiert werden.

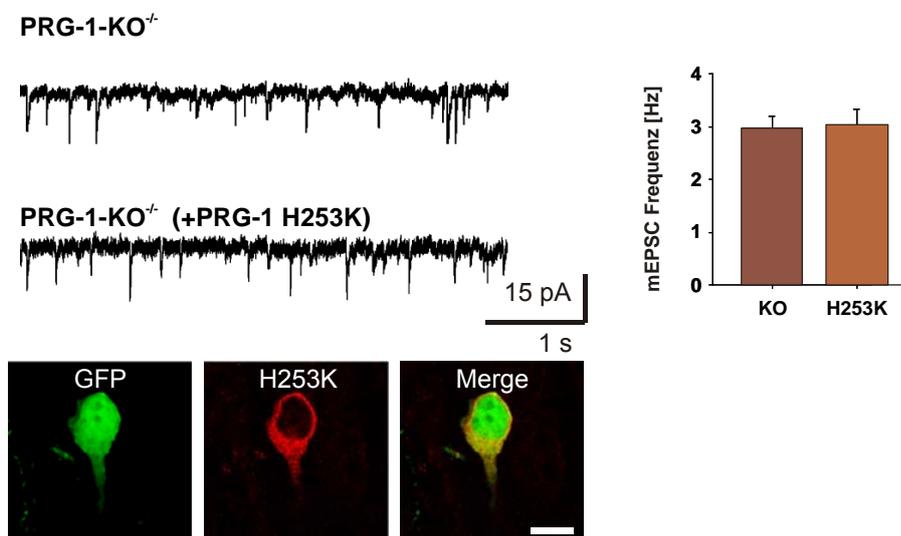


Abbildung 37. Einfluss von Lipid Phosphaten an der von PRG-1 modulierten synaptischen Transmission. Eine Punktmutation im PRG-1 Protein (H253K), die in Lipid-Phosphat-Phosphatasen zu einer Störung der Interaktion mit Lipid Phosphaten führt, führt zu keiner Normalisierung der mEPSC Frequenz in PRG-1-KO CA1 Pyramidenzellen, wenn es dort durch *in utero* Elektroporation exprimiert wird. Die unteren Bilder zeigen immunhistochemische Aufnahmen der GFP-positiven, PRG-1-H253K exprimierenden Zelle (MB: 15 μ m).

Zunächst wurde dafür das in pCR2.1-TOPO rekombinierte PRG-1 cDNA PCR Produkt (siehe C.2.6) mittels der unter B.1.7.11 aufgeführten Primer und des Site-specific Mutagenesis Kit (siehe B.2.2.8.2) mutiert und anschließend erneut in den *Cla* I / *Bam*H I linearisierten pCAG-IRES-GFP Vektor (siehe Abbildung 34 B) kloniert, um den Vektor pCAG-mPRG1-H253K zu erhalten. Anschließend wurde das mutierte Protein PRG-1-H253K mittels *in utero* Elektroporation in PRG-1-KO Mäusen exprimiert und die spontane Vesikelfreisetzung durch die Messung der mEPSCs von KO und GFP positiven Zellen durch die Kooperation mit der

AG Prof. Schmitz (Charité, NWFZ) analysiert. Im Gegensatz zur Expression des WT Proteins (siehe Abbildung 35 A), war die mEPSC Frequenz in den PRG-1-H253K exprimierenden, GFP positiven Zellen nicht reduziert. Eine Komplementierung des KO Phänotyps konnte mit dem mutierten Protein somit nicht erreicht werden (t-Test, $p < 0,855$, GFP⁺/PRG-1^{H253K+}: $n = 8$, $3,04 \pm 0,29$ Hz; GFP⁺/PRG-1-KO: $n = 4$, $2,96 \pm 0,23$ Hz; siehe Abbildung 37).

C.2.7.3 PRG-1/LPA₂ - KOs zeigen keine höhere Erregbarkeit

Um einen weiteren Zusammenhang zwischen PRG-1 und der LPA Signaltransduktion darstellen zu können, wurden heterozygote PRG-1-KO Mäuse mit homozygoten KO Mäusen für den LPA₂ Rezeptor [125] verpaart. Die PRG-1-KO und LPA₂-KO heterozygoten Nachkommen wurden anschließend erneut verpaart, um Nachkommen zu erzeugen, die homozygot KO für PRG-1 und LPA₂ sind. Die Genotypisierungs-PCR für den LPA₂-KO Genotyp wurde nach Contos et al. 2002 [125] durchgeführt.

Interessanterweise konnten an den generierten Doppelknockout (dKO) Mäusen keine spontanen Anfälle beobachtet werden. Die dKO Maus zeigte keine erhöhte Mortalität wie es in der einzel KO Maus für PRG-1 beobachtet wurde und entwickelte sich in Bezug auf die Gewichtszunahme im Vergleich zum WT normal. Der Vergleich der Gewichte zwischen WT, KO und dKO ergab jedoch signifikante Unterschiede in Bezug zum einzel KO bei P20-21 (ANOVA mit post hoc Bonferroni; $p < 0,001$; WT $n = 26$, PRG-1-KO $n = 27$, PRG-1/LPA₂-KO $n = 5$; siehe Abbildung 38 A).

Durch die Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Schmitz (Charité, NWFZ) war es möglich, die dKO Maus elektrophysiologisch durch M.Sc. Prateep Beed und Dr. Sebastian Schuchmann näher zu charakterisieren. So zeigte die Messung des Anstieges der Feldpotentialänderungen (fEPSPs) an hippocampalen Schnitten ($n = 7$) keine Unterschiede zu Schnitten von WT Mäusen ($n = 3$) (t-test, $p > 0,05$ für jeden Fiber Volley, siehe Abbildung 38 B). Im Gegensatz dazu zeigte die Analyse der mEPSC Frequenz auf Einzelzellebene eine signifikante Verringerung gegenüber dem PRG-1-KO (t-test, $p < 0,001$, dKO: $n = 7$, $1,60 \pm 0,13$ Hz; KO: $n = 8$, $3,48 \pm 0,22$ Hz, siehe Abbildung 38 C). Durch EEG Aufnahmen bei P20-22 konnte auch im dKO keine hypersynchrone Aktivität festgestellt werden (siehe Abbildung 38 D).

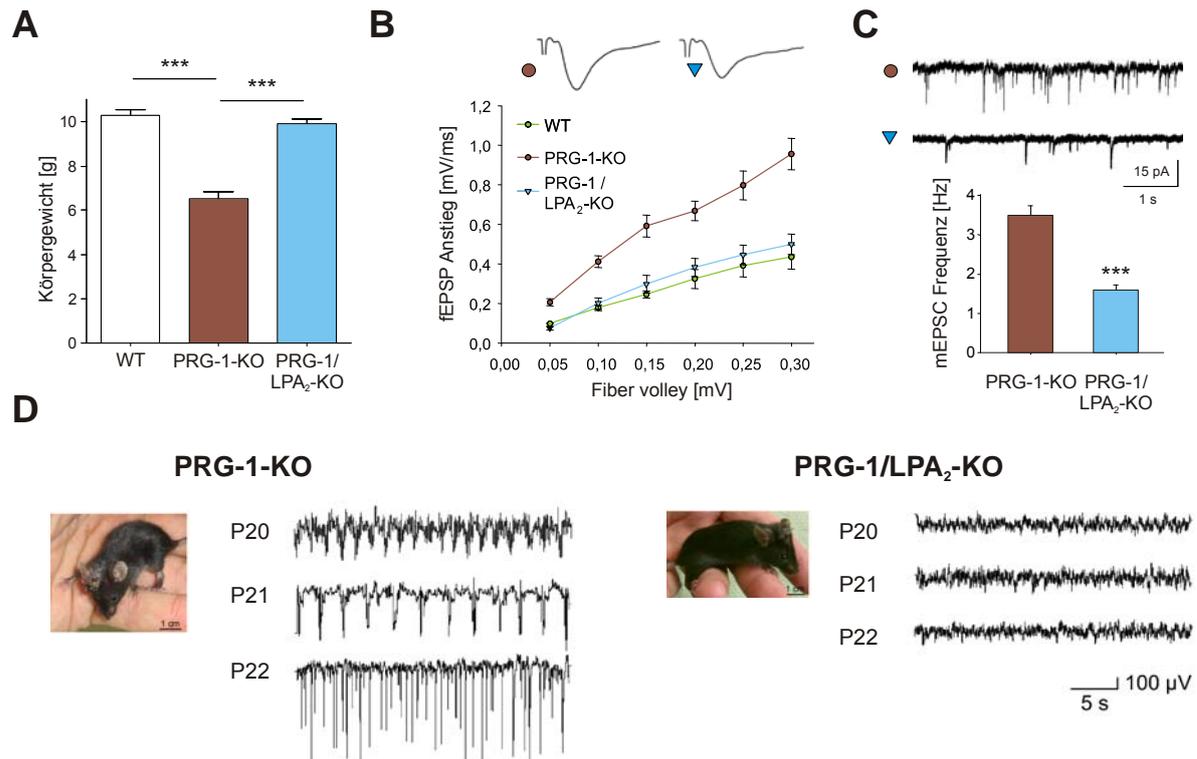


Abbildung 38. Der PRG-1/LPA₂ Doppelknockout (dKO) zeigt keine höhere Erregbarkeit. **(A)** Körpergewicht zwischen P20-21. Keine Unterschiede zum WT, aber signifikante Unterschiede zum PRG-1-KO. **(B)** Die Messung des Anstieges der fEPSPs zeigt, dass die dKO Maus einen Anstieg, ähnlich der der WT Maus, zeigt. **(C)** Die Messung der mEPSCs zeigt eine Normalisierung der Frequenz auf WT Niveau. **(D)** EEG Aufnahmen der dKO zeigen keine hypersynchrone Aktivitäten zwischen P20-22 (n=4). Bilder zeigen operierte PRG-1-KO und dKO Mäuse.

D DISKUSSION

D.1 Generierung der PRG-1 defizienten Mäuse

Zur Analyse der physiologischen Rolle von PRG-1 wurden in dieser Promotion PRG-1 defiziente Mäuse hergestellt. Dazu wurden zum einen ein konstitutiver KO, durch den spezifischen Austausch der Exons 4 bis 6 mit einer *LacZ* Reporter und Neomycin Resistenz Kasette, und zum anderen ein konditioneller KO, durch die spezifische Integration von zwei *LoxP* Sites innerhalb von Intron 3 und 6, generiert. Die konstitutive KO Maus führt zur Ausschaltung des Gens in allen Körperzellen und ermöglichte die gleichzeitige Analyse der endogenen PRG-1 Expression durch den *LacZ* Reporter. Mittels eines gezielten Gentransfers der *cre*-Rekombinase durch *in utero* Elektroporation erlaubte die konditionelle KO Maus *prg-1* zellspezifisch zu deletieren und die Auswirkungen einer PRG-1 Defizienz auf Einzelzellebene zu studieren.

Bei der Herstellung der Zielvektoren für den konstitutiven KO (pPRG1-KO) und den konditionellen KO (pPRG1-cKO) sind verschiedene Klonierungsmethoden angewendet worden. So wurde pPRG1-KO durch PCR Amplifikation der homologen Bereiche und anschließender Ligationen der Fragmente zum Zielvektor hergestellt. Für die homologe Rekombination in den ES-Zellen besaß der Zielvektor dadurch 4,6 kb und 1,3 kb große homologe Fragmente. Der pPRG1-cKO Vektor wurde mittels Red-Rekombinationstechniken [102] hergestellt, so dass die *LoxP* sites unabhängig von endogenen Restriktions-schnittstellen in die Vektor-DNA eingefügt und für die homologe Rekombination in den ES-Zellen größere Fragmente (10 kb und 3,5 kb) angeboten werden konnten. Das Screening der positiv rekombinierten ES-Zellen für den konstitutiven KO konnte aufgrund der geringen Größe des kurzen 3' homologen Arms des pPRG1-KO Vektors (1.3 kb) mittels PCR Analysen durchgeführt werden. Im Gegensatz dazu musste für den konditionellen KO der zeitaufwendigere Southern Blot als Screening Methode eingesetzt werden, da eine erste positive Kontroll PCR über den 3' homologen Arm mit über 3,5 kb nicht erfolgreich war.

Trotz dieses aufwendigeren Screeningsverfahrens ist diese Methode vorteilhaft, da die Ausbeute an positiv rekombinierten ES-Zell Klonen besser als bei der konstitutiven KO Maus war. Insgesamt wurden bei der pPRG1-KO Elektroporation nur 3 von 672 untersuchten Klonen als positiv rekombiniert identifiziert. Hingegen besaßen 7 von 480 untersuchten Klonen das richtig rekombinierte Transgen bei der pPRG1-cKO Elektroporation. Dies lässt sich zum einen durch die unterschiedlichen Größen der angebotenen homologen Bereiche und zum anderen auch durch den Gebrauch der zusätzlichen negativen Selektionskasette im pPRG1-cKO Zielvektor erklären. Je größer die homologen Bereich, desto größer ist auch

die Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination in den ES-Zellen [126]. Der negative Selektionsmarker, das Diphtheria Toxin A Fragment (DTA), führt zu einem Stopp der Proteintranslation und zu einem Zelltod bei einer unspezifischen Integration des Transgens [127], so dass es dabei zu einer Anreicherung an sequenzspezifisch rekombinierten, G418 resistenten ES-Zellen kommen kann. Die unterschiedlichen Erfolge der Keimbahntransmissionen (PRG-1-KO nach 11 Verpaarungen mit C57/Bl6, PRG1-cKO nach einer Verpaarung mit C57/Bl6) lassen sich nur auf die Qualität der Stammzellen bzw. auf die Qualität der Generierung der chimären Mäuse, nicht jedoch auf die Eigenschaften der Zielvektoren zurückführen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Generierung von KO Tieren mittels Zielvektoren, die über RED Rekombinationstechnologie [102] erzeugt wurden, eine schnellere und effektivere Methode darstellt, als die konventionelle Klonierung der Fragmente aus PCR Produkten.

D.2 PRG-1 ist ein neuronales Molekül, lokalisiert in glutamatergen Synapsen

Synapsen lassen sich anhand ihres Aufbaus, ihrer Transmitter und ihrer postsynaptischen Rezeptorausstattung in exzitatorische (erregende) und inhibitorische (inhibierende) Synapsen einteilen. Glutamaterge Synapsen gehören zu den exzitatorischen Synapsen. Auf den meisten Prinzipalneuronen des Gehirns bestehen sie aus einem axonalen präsynaptischen und einem auf einer dendritischen Spine (aktinreiche Ausstülpungen) liegenden postsynaptischen Teil (Review: [128]). Ihr Transmitter L-Glutamat ist der wichtigste erregende Neurotransmitter im Zentralen Nervensystem (ZNS) und interagiert mit spezifischen Glutamatrezeptoren in der postsynaptischen Dichte (PSD) [128-130]. Als inhibitorische Synapsen werden GABAerge Synapsen bezeichnet. Anders als bei exzitatorischen Synapsen bilden Axone der inhibitorischen Neurone auf glutamatergen Neuronen nicht Kontakte mit einer postsynaptischen Spine, sondern direkt mit dem dendritischen Schaft aus (Review: [128, 131]). Ihr Transmitter GABA (γ -Aminobuttersäure) wird durch eine enzymatische Decarboxylierung aus L-Glutamat synthetisiert und ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im ZNS [132]. Im Gegensatz zur typischen Spinemorphologie der exzitatorischen Synapse auf glutamatergen Neuronen bilden exzitatorische Synapsen mit überwiegend Spine-freien inhibitorischen Interneuronen keine Spines (Review [131]).

Durch die Generierung der konstitutiven PRG-1-KO Maus konnte die endogene Expression von PRG-1 mittels des gleichzeitig exprimierten Enzyms β -Galactosidase (β -Gal) in Gehirnschnitten dargestellt werden, so dass die bereits durch Bräuer et al. [1] gezeigte

ausschließlich neuronale Lokalisation von PRG-1 bestätigt werden konnte. Weiterhin konnte bei Kolokalisationsstudien zwischen der β -Gal und Markern für inhibitorische Interneurone keine gemeinsame Expression festgestellt werden. Der Nachteil der β -Gal Färbung liegt jedoch darin, dass β -Gal in den Zellkörpern der Neurone akkumuliert, so dass die Lokalisation von PRG-1 innerhalb der Neurone mit einer β -Gal Färbung nicht aufgezeigt werden kann. So können nur immunhistochemische Färbungen, bei denen der PRG-1 Antikörper verwendet wurde, die Lokalisation von endogenem PRG-1 innerhalb der Zelle darstellen. So ist PRG-1 im Hippocampus auf den Membranen der glutamatergen Dendriten der Körner- und Pyramidenzellen gefunden worden.

Für eine genauere Untersuchung der zellulären Lokalisation auf den Membranen der glutamatergen Zellen wurden an unserem Institut weitere immunhistochemische und elektronenmikroskopische Experimente durchgeführt. So konnte gezeigt werden, dass PRG-1 mit Proteinen kolokalisiert, die spezifisch an der PSD von glutamatergen Neuronen lokalisiert sind (ProSAP2, Homer1, [133, 134]). Interessanterweise konnte eine Kolokalisation von PRG-1 mit Gephyrin, einem Marker der PSD von GABAergen Kontakten auf glutamatergen Neuronen [135], nicht gezeigt werden (persönliche Kommunikation, Dr. Johannes Vogt, Charité). Die elektronenmikroskopische Analyse ergab, dass sich PRG-1 bevorzugt nahe bzw. in der PSD der asymmetrischen Synapsen (glutamaterg) lokalisiert. Eine Lokalisation in symmetrischen Synapsen (GABAerg) konnte nicht festgestellt werden (persönliche Kommunikation, Dr. Gregor Laube, Charité).

Die Tatsache, dass 1. PRG-1 nicht in inhibitorischen Neuronen und somit auch nicht auf deren erregenden Eingängen der glutamatergen Synapsen lokalisiert ist und dass 2. PRG-1 spezifische Lokalisationen in glutamatergen Synapsen von exzitatorischen Prinzipalneuronen zeigt, jedoch hier wiederum nicht in inhibitorischen Synapsen zu finden ist, gibt Grund zur Annahme, dass PRG-1 Funktionen ausübt, die in Zusammenhang mit exzitatorischen Vorgängen des ZNS stehen könnten. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass PRG-1 defiziente glutamaterge CA1 Neurone eine höhere glutamaterge Transmission in Form einer erhöhten spontanen Vesikelfreisetzungsfähigkeit (mEPSC) aufweisen als WT Neurone. In Übereinstimmung mit dem generellen Fehlen von PRG-1 in GABAergen, inhibierenden Synapsen auf Pyramidenzellen, zeigten diese PRG-1 defizienten Neurone keine Veränderungen in der inhibierenden, GABAergen, synaptischen Transmissionen (mIPSC). Dies stärkt die Annahme, dass PRG-1 aufgrund seiner Lokalisation in glutamatergen Synapsen auf neuronale, synaptische Signalvorgänge regulierend eingreift.

D.3 PRG-1 Defizienz führt zu einer erhöhten Mortalität aufgrund einer Imbalance zwischen erregenden und inhibitorischen Signalen

Während der Etablierung der PRG-1-KO Zucht wurde festgestellt, dass die PRG-1 defiziente Maus bereits 9 Tage nach der Geburt signifikante Gewichtsunterschiede im Vergleich zu ihren WT Geschwistertieren zeigt. Die Entwicklung der Mäuse ist somit bereits in den juvenilen Stadien beeinträchtigt. Aus heterozygoten Verpaarungen konnte festgestellt werden, dass innerhalb der ersten 3-4 Lebenswochen ca. 50 % der PRG-1-KO Mäuse sterben. Verschiedene Gründe könnten zu dieser erhöhten Mortalität führen.

Aufgrund der oftmals beobachteten auffälligen Verhaltensweisen (vermehrtes Rennen, Springen, Putzen usw.) könnte zunächst angenommen werden, dass die Verminderungen in der Entwicklung des Körpergewichts durch eine Hyperaktivität und damit in einem höheren Energieumsatz begründet ist und eventuell daher eine erhöhte Mortalität in diesen Tieren entsteht. Es könnte jedoch auch angenommen werden, dass eine generelle Störung des ZNS eine verminderte Nahrungsaufnahme bei den KO Tieren bewirkt, so dass die Tiere Körpergewicht verlieren und aufgrund eines Energiemangels sterben. Schließlich konnten ca. 3 Wochen alte KO Tiere beobachtet werden, die spontane Anfälle zeigten, die nach späteren EEG Messungen aus hypersynchronen Aktivitäten und tonisch-klonischen Ereignissen bestehen. Typische postkonvulsive morphologische Veränderungen zeigten die Auswirkungen dieser Ereignisse in adulten Mäusen in Form von hippocampaler Sklerose, Moosfasersprouting und astrozytärer Gliose. Solch eine mit spontanen Anfällen geprägte ZNS Entwicklungsstörung kann mit einem Gewichtsverlust und einer erhöhten Mortalität einhergehen, da Tiere in der postkonvulsiven Phase längere Zeit keine Nahrung zu sich nehmen können. Zudem konnten in den EEG Messungen beobachtet werden, dass bei KO Mäusen, die einen Übergang einzelner Anfälle zu einem Status epilepticus zeigten, in der Folge verstarben.

Im juvenilen, unreifen Gehirn treten epileptische Anfälle generell häufiger auf als im adulten, reifen Gehirn [136-138]. Es wird angenommen, dass die noch fehlende Balance zwischen erregenden und inhibierenden Neurotransmitterwirkungen während der Entwicklung ein Grund für diese Erscheinung ist. So ist beispielsweise die inhibitorische, hyperpolarisierende Wirkung von GABA in unreifen Neuronen noch nicht vorhanden. Dort wirkt GABA aufgrund veränderter Chloridkonzentrationen innerhalb der Nervenzelle erregend [139]. Die Balance zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Vorgängen ist in dem sich entwickelnden Gehirn demzufolge noch nicht ausgereift. Störungen in der Entwicklung der Regelung dieser Vorgänge würden unweigerlich das System beeinträchtigen und zu pathologischen Effekten, wie zum Beispiel einer Übererregbarkeit in Form einer Epilepsie führen (Review: [140]). Die

Expression von PRG-1 in den Dendriten der glutamatergen Neurone beginnt perinatal und erreicht ihr Maximum Anfang der dritten postnatalen Woche (P15) [1, 2]. Dies ist die Zeitspanne mit der umfangreichsten Synaptogenese, in der sich erregende glutamaterge Synapsen bilden und erregenden GABAergen Synapsen zu inhibierenden GABAergen Synapsen werden (Review: [140]).

In der Tat konnten durch Messungen der Feldpotentiale (fEPSP) und der spontanen Vesikelfreisetzungen (mEPSC / mIPSC) gezeigt werden, dass die Balance zwischen inhibitorischen und exzitatorischen Vorgängen in der PRG-1-KO Maus im Vergleich zum WT gestört ist. So konnte am Ende der dritten Lebenswoche in hippocampalen Schnitten dieser Tiere eine signifikant höhere Erregbarkeit (fEPSP slope) und eine höhere mEPSC Frequenz, jedoch keine Veränderung der inhibitorischen mIPSC Frequenz festgestellt werden. Demnach kann angenommen werden, dass im sich entwickelnden Gehirn durch das Fehlen von PRG-1 die Balance zwischen inhibitorischen und exzitatorischen Vorgängen, durch eine Erhöhung der Excitation bei gleichbleibender Inhibition, Veränderungen unterliegt. Diese Veränderungen führen somit in einigen Mäusen zu den spontanen konvulsiven Anfällen.

Kainatapplikationen an adulten, überlebenden PRG-1-KO und interessanterweise auch an heterozygoten PRG-1-KO Mäusen konnten zeigen, dass diese eine niedrigere Anfallsschwelle besitzen. Da an nicht mit Kainat behandelten, heterozygoten PRG-1-KO Tieren keinerlei konvulsive Anfälle beobachtet wurden, kann angenommen werden, dass die niedrigere Anfallsschwelle in diesen Tieren durch die direkte pathologische Wirkung des Fehlens der Hälfte des PRG-1 Proteins entstanden sein muss.

D.4 Höhere Erregbarkeit ist eine direkte Folge der PRG-1 Defizienz und durch eine fehlende retrograde Aktion von PRG-1 begründet

Aufgrund der beobachteten spontanen konvulsiven Anfälle bei P21 und der höheren Anfallsbereitschaft in älteren KO sowie heterozygoten Mäusen, wurden bei P21 morphologische Untersuchungen im Hinblick auf Unterschiede in der Reifung und Verteilung der inhibitorischen und exzitatorischen Neurone durchgeführt. Die Färbungen mit dem neuronalen Marker NeuN (reife Neurone) [141], und mit Parv, der inhibierende Interneurone darstellt [116], ließen jedoch keine Unterschiede zwischen KO und WT erkennen.

Die elektrophysiologischen Messungen an PRG-1 defizienten Tieren im Rahmen der Kooperation mit der AG Prof. Schmitz ergaben, dass die intrinsischen Eigenschaften der P21 CA1 Neurone, wie das Ruhemembranpotential und die Amplitude der Aktionspotentiale, gegenüber WT Tieren vergleichbar sind. Hieraus ergibt sich eine zunächst ungestörte basale neuronale Funktionsfähigkeit der Zellen. Allerdings zeigten Feldpotentialmessungen

(fEPSP), dass die PRG-1 defizienten Mäuse einen größeren Anstieg der Anregungskurve (input/output) besaßen als WT Mäuse. Weiterhin zeigten KO Tiere eine größere EPSC Amplitudenantwort als ihre WT Geschwistertiere. Die Messungen der spontanen Vesikelfreisetzen der exzitatorischen und inhibitorischen PSC (mEPSC, mIPSC) ergab, dass die PRG-1 defizienten Mäuse signifikant höhere mEPSC Frequenzen besaßen als WT Mäuse. Die Amplituden dieser Ströme waren jedoch nicht verändert (persönliche Kommunikation, Prateep Beed, Charité).

Veränderungen solcher Art können prä- oder postsynaptische Ursachen besitzen, die in einem komplexen Zusammenhang stehen können. Nach dem Eintreffen eines Aktionspotentials am präsynaptischen Neuron kommt es zur Depolarisation und zur Aktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle an Axonendigungen. Durch den Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration erfolgt an der „Aktiven Zone“ der Präsynapse die Exozytose von Vesikeln. Die in den Vesikeln befindlichen Neurotransmitter gelangen so in den synaptischen Spalt und diffundieren zu den an der postsynaptischen Membran befindlichen Rezeptorproteinen. Diese werden daraufhin aktiviert, so dass es zu einem Ein- bzw. Ausstrom von Ionen zwischen Intra- und Extrazellulärraum kommt, wodurch ein Potential auf der postsynaptischen Membran entsteht. Wenn ein bestimmtes Schwellenpotential erreicht wird, kann ein weiteres Aktionspotential von dieser postsynaptischen Potentialänderung ausgehen. Aufgrund dieser Prinzipien können Veränderungen der synaptischen Ströme aus Veränderungen an der Prä- und an der Postsynapse resultieren (Review: [142]). So könnte in der Präsynapse der für die Exozytose befindliche Transmitterpool erhöht (ready release-able pool) und der Rücktransport der Neurotransmitter in die Präsynapse verringert sein. Ebenso könnte aber auch die aktiv eingebrachte Rezeptoraustattung in der PSD der Postsynapse verändert sein, so dass das Schwellenpotential schneller erreicht werden kann.

Um ein unterschiedliches Expressionsniveau an post- oder präsynaptischen Markern, wie Rezeptoren und Transportern zu untersuchen wurden immunhistochemische Färbungen von P21 hippocampalen Schnitten und Western Blot Analysen von Synaptosomenfraktionen durchgeführt. Es konnten jedoch keine Veränderungen in der Expression bzw. Lokalisation dieser Proteine bei P21 alten Tieren festgestellt werden. Weitere Western Blot Analysen der Expression der postsynaptischen Marker in Präparationen der Postsynaptischen Dichte ergaben ebenfalls keine Unterschiede (persönliche Kommunikation, Dr. Hiroshi Kawabe, MPI, Göttingen). Des Weiteren wurden an unserem Institut quantitative immunhistochemische Analysen in Bezug auf die Koloalitionen von VGlut1 und aktiven, in der PSD befindlichen GluR1 an der CA1 Pyramidenzelle durchgeführt. Diese ergaben ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen PRG-1-KO und WT Maus bei P21 (persönliche Kommunikation, Dr. Johannes Vogt, Charité). Dass die Anzahl an aktiven

erregenden Rezeptoren auf der Postsynapse nicht verändert ist, zeigen auch AMPA/NMDA Ratios, die an KO und WT Mäusen gemessen wurden. So konnte gezeigt werden, dass trotz der höheren EPSC Amplitude im PRG-1-KO Schnitt, das Verhältnis der durch AMPA Rezeptoren bzw. NMDA Rezeptoren vermittelten erregenden Antworten (EPSC) zwischen hippocampalen Schnitten von PRG-1-KO und WT Mäusen nicht signifikant verschieden war (persönliche Kommunikation, Prateep Beed, Charité).

All diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Post- und die Präsynapse in ihrer Ausstattung an den wichtigsten Rezeptoren bzw. Transportern (GluRs, NMDA-R, VGlut1, VGat) zwischen PRG-1-KO und WT Tieren nicht verändert sind. Die in PRG-1-KO Tieren erhöhte Erregung in Form der mEPSC Frequenz könnte demzufolge nur durch Veränderungen der präsynaptischen Vesikelfreisetzung, zum Beispiel in Form eines höheren „Ready Releaseable Pools“, begründet sein. Dies würde allerdings bedeuten, dass PRG-1 retrograde Funktionen innerhalb der glutamatergen Synapse ausüben muss. Es müsste ausgehend von der postsynaptischen Lokalisation die Präsynapse beeinflussen können.

Um diese Hypothese näher zu untersuchen, wurden verschiedene Experimente auf der Grundlage der *in-utero* Elektroporation (IUE) durchgeführt. So wurde als erstes PRG-1 wieder in PRG-1-KO Zellen exprimiert. Hierzu wurde die Technik so eingesetzt, dass selektiv CA1 Pyramidenzellen der hippocampalen Anlage bei E15 transfiziert werden konnten (siehe Abbildung 39 A, Methode nach [143]). Die Messung der PRG-1 exprimierenden CA1 Zellen bei P21 ergab eine Normalisierung der mEPSC Frequenz ähnlich der Frequenz von WT Tieren. Die Nachbarzellen allerdings, die PRG-1 nicht exprimierten, zeigten den beobachteten Phänotyp der hohen Frequenz. Da die Mehrheit der Afferenzen der CA1 Pyramidenzellen von den Schaffer-Kollateralen der PRG-1-KO CA3 Neurone stammen, und demzufolge die Präsynapse einen KO Genotyp darstellt, bedeutet dies, dass das elektroporierte PRG-1, auf der postsynaptischen Seite (CA1) liegend, die Vesikelfreisetzung der KO-Präsynapse (CA3) beeinflussen muss (siehe Abbildung 39 B). Somit kann angenommen werden, dass PRG-1 auf der Präsynapse keine direkten Funktionen hat, sondern eher von der Postsynapse seine Funktionen ausüben muss.

Um diesen Punkt, die postsynaptische Aktivität von PRG-1, weiter zu untersuchen, wurde in einem weiteren Schritt *prg-1* spezifisch nur auf dieser postsynaptischen Seite deletiert. Hierzu konnte die in dieser Arbeit generierte konditionelle PRG-1-cKO eingesetzt werden. Dazu wurden in homozygot gefloxt PRG-1-cKO Mäuse Cre Rekombinase mittels IUE bei E15 in CA1 Pyramidenzellen exprimiert. Die elektrophysiologische Messung der nun PRG-1 defizienten CA1 Pyramidenzellen ergab eine signifikante Erhöhung der mEPSC Frequenz im Vergleich zu homozygot gefloxten konditionellen PRG-1-cKO (WT) CA1 Zellen im selben Schnitt.

Da die Mehrheit der Eingänge der CA1 Zellen von den Schaffer-Kollateralen der WT CA3 Neurone abstammt, bedeutet dies, dass der gemessene Phänotyp allein durch das Fehlen von PRG-1 auf der Postsynapse erklärt werden kann (siehe Abbildung 39 C). Da die Umgebung dieser PRG-1 defizienten Neurone einen WT Genotyp besitzen, kann weiterhin angenommen werden, dass der beobachtete Phänotyp in PRG-1-KO Mäusen nicht durch generelle Entwicklungsstörungen des neuronalen Netzwerkes oder durch indirekte Effekte der *prg-1* Deletion ausgelöst wird, sondern direkt durch das Fehlen einer vermutlich modulatorischen, retrograden Funktion von postsynaptisch lokalisierten PRG-1 auf die exzitatorische, präsynaptische Transmission.

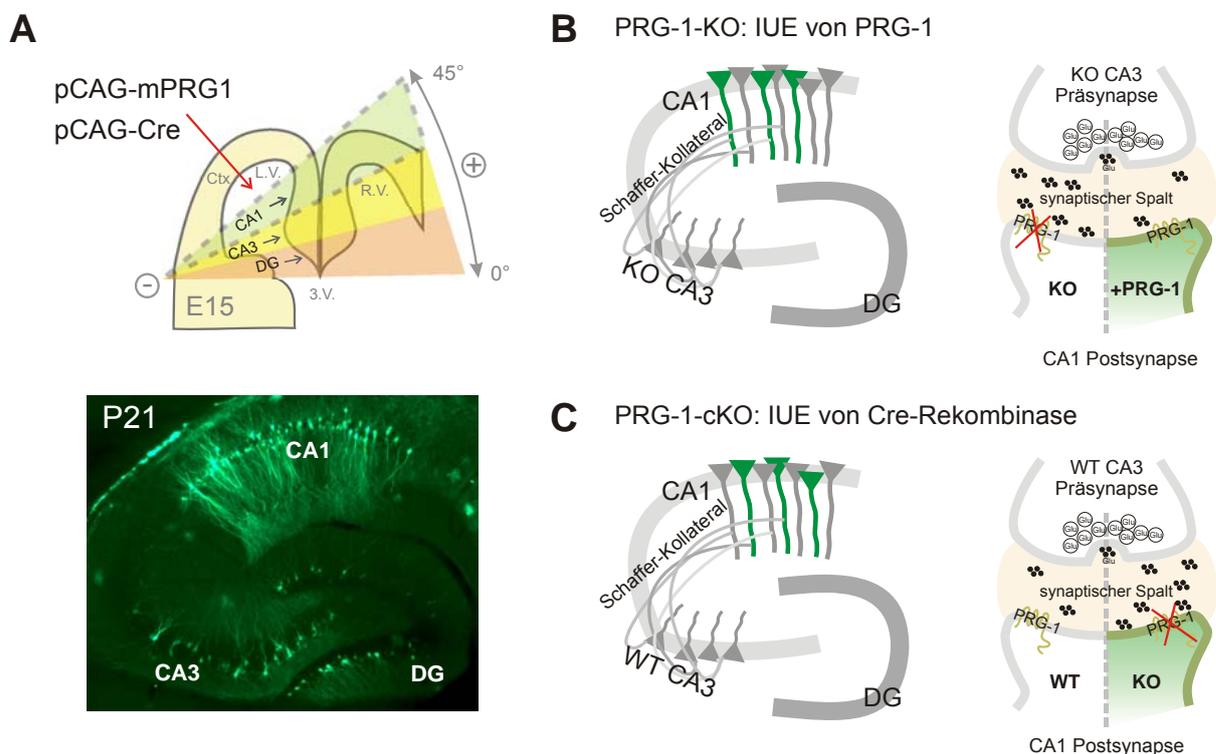


Abbildung 39. Schematische Darstellungen der IUE von PRG-1 und Cre-Rekombinase zur Analyse der direkten, post-synaptischen Funktion von PRG-1. **(A)** Oben: Schema der IUE bei E15. Durch die Injektion der pCAG Konstrukte in den Ventrikel konnte per Stromimpuls in die Richtung elektroporiert werden, die später die CA1 Formation bilden wird (Ctx: Kortex, L.V.: linker Ventrikel, R.V.: Rechter Ventrikel, 3.V.: 3. Ventrikel, modifiziert nach [143]). Unten: Aufnahme des Hippocampus eines elektroporierten Gehirns bei P21. Überwiegend CA1 Neurone exprimieren GFP. **(B)** IUE von PRG-1 in PRG-1-KO Tiere bewirkt eine Normalisierung der mEPSC Frequenz. Elektroporierte CA1 Neurone exprimieren PRG-1 postsynaptisch. Synapsen dieser Neurone bestehen somit aus PRG-1-KO Präsynapsen und PRG-1 exprimierenden Postsynapsen. **(C)** IUE von Cre in PRG-1-cKO bewirkt eine Erhöhung der mEPSC Frequenz. Elektroporierte CA1 Neurone sind PRG-1 defizient, bilden jedoch Synapsen mit dem WT CA3 Schaffer-Kollateral.

D.5 PRG-1 moduliert die synaptische Transmission durch seinen Einfluss auf die präsynaptische LPA Signaltransduktion

Um die beobachteten Ergebnisse der Übererregbarkeit in einen Zusammenhang mit der in einem PRG-1-KO Tier möglicherweise veränderten LPA Signaltransduktionen näher zu untersuchen, wurden Experimente durchgeführt, die zeigen, in welcher Art und Weise PRG-1 die LPA Signaltransduktion beeinflussen könnte.

So konnte zunächst an primären Neuronen gezeigt werden, das PRG-1-KO Neurone eine geringere Fähigkeit besitzen ein fluoreszierendes Phosphatidat (PA) Analogon aufzunehmen. Ruth Lehmann und ihre Kollegen konnte bereits an Experimenten mit dem *Drosophila* LPP Wunen zeigen, dass die Expression dieses Proteins die Aufnahme eines fluoreszierenden PA Analogons in Zellen vermittelt [100]. Es wird hierbei angenommen, dass Wunen dieses PA dephosphoryliert und somit der nun nicht mehr polare Fettsäureteil über die Zellmembran in die Zellen gelangen kann und dort akkumuliert [100] (Review: [4]). Durch Sequenzvergleiche zwischen den LPPs und PRG-1 wird jedoch deutlich, dass PRG-1 nicht über das komplette von Stukey und Carman entdeckte Phosphatase Motiv verfügt und demzufolge PA nicht über diesen Mechanismus dephosphorylieren und somit der Fettsäurerest nicht in gleicher Weise in die Zelle kommen kann, wie es bei *Drosophila* LPP Wunen postuliert wird (siehe Abbildung 4) [30, 100, 101]. Eine Veränderung der Aktivität von LPPs in PRG-1-KO Mäusen konnte mit dem in unserem Labor zur Verfügung stehenden Mitteln nicht gezeigt werden. Lediglich die Expression dieser LPPs (LPP1-3) mittels quantitativer RT-PCR deutete darauf hin, dass es keine Veränderungen in dem Expressionsniveau zwischen den WT und PRG-1-KO Tieren gibt (persönliche Kommunikation, Tanja Velmanns, Charité).

Durch die IUE des mutierten PRG-1 Proteins konnte jedoch gezeigt werden, dass das unvollständige Phosphatase Motiv von PRG-1 doch einen Einfluss auf die physiologische Rolle von PRG-1 besitzt. PRG-1 wurde an der extrazellulären Domäne 2 punktmuiert, in dem das konservierte Histidin zu einem Lysin ausgetauscht wurde (H253K). Diese Mutation im Phosphatase Motiv von Maus LPP1 und bei dem *Drosophila* LPP Wunen bewirkte einen vollständigen Aktivitätsverlust [7, 99]. Durch die IUE dieses mutierten Proteins (PRG-1-H253K) in PRG-1-KO Embryos bei E15 konnte die Komplementierung des Phänotypes, wie sie mit WT PRG-1 Protein erreicht wird, nicht erzielt werden. Die mEPSC Frequenz wurde nicht auf WT Niveau verringert. Obwohl dieses mutierte PRG-1 Protein gleiche Lokalisationen aufweist, wie das WT *in utero* elektroporierte Protein (3D Rekonstruktionen und gleiche Kolokalisationen mit postsynaptischen Markern, persönliche Kommunikation, Dr. Johannes Vogt, Charité), kann es nicht die pathologische Erhöhung der synaptischen

Transmission aufheben. Dieses Ergebnis und die Aufnahmeexperimente mit fluoreszierendem PA fördern die Annahme, dass PRG-1 in die glutamaterge Signaltransduktion durch eine Interaktion mit Lipid Phosphaten in dem synaptischen Spalt an der postsynaptischen Seite eingreifen könnte.

Um diese Interaktion mit Lipidphosphaten in den Kontext der modulatorischen Aktivität von PRG-1 auf die LPA Signaltransduktion darzustellen, sollte das Zusammenwirken zwischen PRG-1 mit dem auf Neuronen am stärksten exprimierten LPA Rezeptor (LPA₂) (persönliche Kommunikation, Olga Kieselmann, Charité) untersucht werden. Hierzu wurde die PRG-1-KO Maus mit einer bereits beschriebenen LPA₂ defizienten Maus verpaart, die keine auffälligen phänotypischen Veränderungen besitzt [125]. Die Generierung der PRG-1/LPA₂ Doppelknockout Maus (dKO) zeigte, dass neben PRG-1 auch LPA₂ Einfluss auf die synaptische Transmission haben muss, da die dKO Maus den pathologischen Phänotyp der PRG-1-KO Maus aufheben konnte. Die Mäuse entwickelten sich normal und zeigten keine spontanen konvulsiven Anfälle. Die elektrophysiologischen Untersuchungen zeigten, dass die Ergebnisse der Messungen der Feldpotentiale (fEPSP) und der mEPSC Frequenzen denen der WT Mäuse glich. Die in unserem Institut durchgeführten immunhistochemischen Analysen der LPA₂ Expression in hippocampalen Schnitten zeigten Kollokalisierungen von LPA₂ mit Markern der Präsynapsen (persönliche Kommunikation, Dr. Johannes Vogt, Charité). Aufgrund dieser Ergebnisse kann angenommen werden, dass präsynaptische LPA₂ Rezeptoren, vermittelt durch extrazelluläres LPA, die exzitatorische Transmission auf der Präsynapse, durch zum Beispiel Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration, beeinflussen könnten. In der Tat konnte durch LPA Applikationen auf akuten hippocampalen Schnitten festgestellt werden, dass der LPA₂ Rezeptor die glutamaterge Transmission moduliert. In WT Schnitten führt die LPA Applikation zu einer Erhöhung der glutamatergen Transmission, wohingegen in LPA₂- KO Schnitten keine Erhöhung festgestellt werden konnte (persönliche Kommunikation, Dr. Ulf Strauss, Arne Battefeld, Charité). Dieser Prozess könnte durch eine Interaktion von PRG-1 mit diesem extrazellulären LPA von der glutamatergen Postsynapse aus reguliert sein, so dass die Aktivierung des präsynaptischen LPA₂ Rezeptors und damit die exzitatorische Transmission über PRG-1 gesteuert würde. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass in älteren PRG-1-KO Tieren (P30) neben der Normalisierung der EEGs auch die erhöhten fEPSPs als Ausdruck einer erhöhten neuronalen Erregbarkeit abnehmen (persönliche Kommunikation, Prateep Beed, Charité). Eine mögliche Erklärung, die den Einfluss des LPA₂ Rezeptors auf diesen Phänotyp erklären könnte ist, dass die Expression von LPA₂ in adulten Stadien gegenüber jungen Stadien vermindert ist [125, 144] und es somit zu einer Kompensation des Ungleichgewichtes zwischen Erregung und Inhibition in dem entwickelten Gehirn der adulten Tiere kommen könnte.

Interessanterweise waren die beobachtete neuronale Übererregbarkeit (fEPSP-Messungen) und ebenfalls die erhöhte Anfallsbereitschaft nach Kainat-Applikationen, abhängig von der Gendosis von PRG-1. Heterozygote PRG-1-KO Mäuse zeigten jeweils Werte, die zwischen WT und PRG-1 defizienten Mäusen lagen. Da im Allgemeinen angenommen wird, dass Proteine mit enzymatischen Funktionen wenig sensitiv auf Gendosisvariationen reagieren (Haplosuffizient) [145], spricht diese Tatsache der linearen Beziehung zwischen Phänotyp und Proteinexpression (Haploinsuffizient) gegen eine einfache enzymatische Funktion von PRG-1. Es deutet vielmehr auf eine Funktion, bei der PRG-1 in der Modulation der synaptischen Transmission einen limitierenden Faktor darstellen könnte. Die Tatsache, dass LPA-induzierte Neuritenretraktion in PRG-1 überexprimierten Zellen verhindert werden kann [1] und die Verringerung des Vermögens PRG-1 defizienter Neurone bioaktive Lipide wie PA aufzunehmen, lässt vermuten, dass PRG-1 das Niveau an Lipid Phosphaten an der Synapse durch nicht-enzymatische Mechanismen kontrollieren könnte. Es wäre demzufolge denkbar, dass sich die physiologische Rolle von PRG-1 von der klassischen Dephosphorylierung der LPPs entfernt hat, hin zu Mechanismen, die eher Sensor- oder Rezeptor/Transporter-ähnlichen Aktivitäten gleichen. Dies konnte bereits bei anderen, untereinander ebenfalls evolutionär verwandten Proteinen gezeigt werden, bei denen sich ihre Funktionen aufgrund von Mutationen in kritischen katalytischen Aminosäurenresten anders entwickelten als bei ihren enzymatisch aktiven Verwandten [146]. Ebenfalls wäre es denkbar, dass neben dem unvollständigen Phosphatase Motiv auch der 400 AS lange C-terminale Bereich von PRG-1 eine Rolle in der Modifizierung der LPA Signaltransduktion einnimmt. Durch Interaktionen mit anderen Proteinen auf der intrazellulären Seite der Postsynapse wäre es möglich, PRG-1 als ein Protein in einem Verband von Proteinen zu sehen, die über das Bindeglied LPA von der postsynaptischen Seite aus die Transmitterfreisetzung auf der Präsynapse regulieren könnten, um eventuelle Übererregbarkeiten auf der Rezeptorseite kompensieren zu können.

Die nach Läsion (ECL) beobachtete Hochregulation des *prg-1* Transkripts [1] könnte durch die generellen plastischen Umbauprozesse erklärt werden, da bei der Generierung neuer Synapsen für deren Funktionsfähigkeit PRG-1 neu in die Postsynapse exprimiert werden muss. Die Tatsache, dass an unserem Institut auch gezeigt werden konnte, dass das LPA produzierende Enzym ATX/NPP2 ebenfalls nach einer ECL in der Expression erhöht ist [147], lässt die Überlegung zu, dass nach einer Läsion die LPA Konzentration erhöht wäre, und somit Neurone einer höheren Excitation in Form einer höheren Transmitterfreisetzungswahrscheinlichkeit durch aktivierte LPA₂ Rezeptoren auf der präsynaptischen Seite ausgesetzt wären. Durch die gleichzeitig erhöhte Expression von PRG-1 nach einer Läsion wäre es nun auch denkbar, dass PRG-1 hierbei regulierend einwirken könnte, in dem es die Konzentration an LPA an der Synapse senkt.

D.6 Fazit und Ausblick

Die in dieser Promotion generierten PRG-1 defizienten Mausmodelle erlaubten es, die physiologische Rolle von PRG-1 näher zu untersuchen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die im KO Tier beobachtete Übererregbarkeit der glutamatergen Neurone in Form einer erhöhten präsynaptischen Transmitterfreisetzungen und die bei einem Teil der Tiere am Ende der 3. Lebenswoche gezeigten konvulsiven Anfälle in einer spezifischen physiologischen Rolle von PRG-1 auf der postsynaptische Seite von glutamatergen Synapsen auf exzitatorischen Neuronen begründet ist (siehe Abbildung 40).

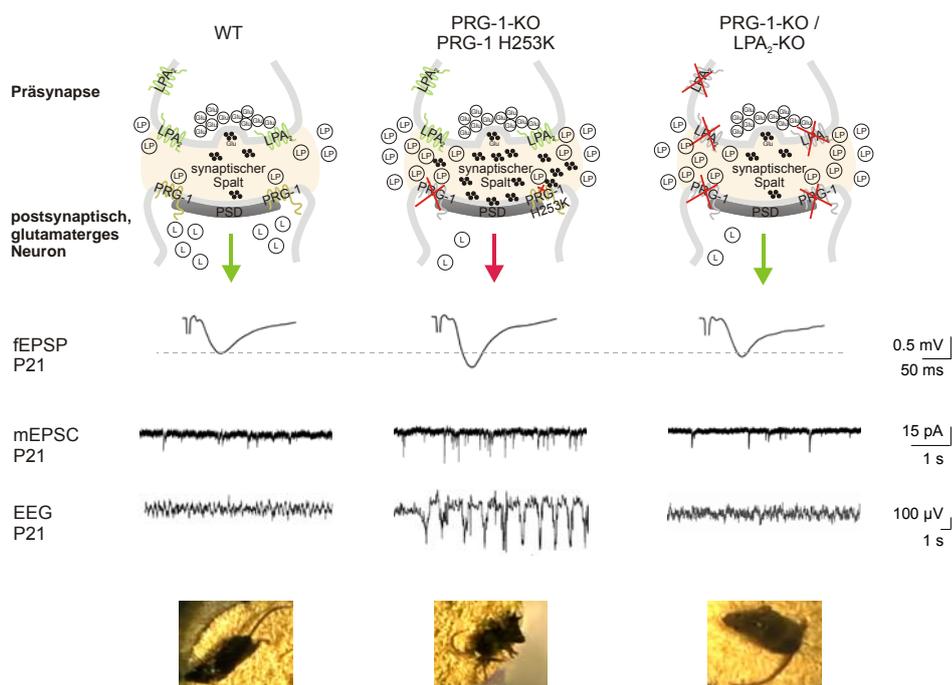


Abbildung 40. Modellschema: PRG-1 moduliert die glutamaterge synaptische Transmission durch eine LPA_2 vermittelte präsynaptische LPA Signaltransduktion. In der WT Synapse reguliert postsynaptisches PRG-1 durch Aufnahme von Lipiden (L), die Konzentration von Lipidphosphaten (LP) im synaptischen Spalt und damit die Aktivierung des präsynaptischen LPA_2 Rezeptors. An der KO Synapse fehlt diese regulatorische Funktion. Es kommt zu einer Anreicherung von Lipidphosphaten und damit zu einer erhöhten Aktivierung des präsynaptischen LPA_2 -R. Dieser könnte durch G-Protein gekoppelte Signaltransduktionsvorgänge eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration die Transmitterfreisetzungswahrscheinlichkeit erhöhen, so dass es zu einer höheren fEPSP Antwort, einer höheren mEPSC Frequenz und womöglich durch ein Ungleichgewicht an inhibitorischen und exzitatorischen Signalen zu einem konvulsiven Anfall bei P21 kommt. In der PRG-1/ LPA_2 dKO Maus ist die präsynaptische LPA_2 vermittelte Signaltransduktion ausgeschaltet, so dass es trotz PRG-1 Defizienz zu keiner erhöhten Transmitterfreisetzungswahrscheinlichkeit und daher keinen erhöhten synaptischen Transmissionen und folglich zu keinen konvulsiven Anfällen kommt.

Dieser retrograde post- präsynaptische Mechanismus von PRG-1 konnte mittels IUE in CA1 Neuronen dargestellt werden. Durch Zellkulturexperimente an primären Neuronen konnte weiterhin gezeigt werden, dass KO Neurone eine verminderte Fähigkeit besitzen, extrazelluläre Lipidphosphate intrazellulär zu akkumulieren, was darauf schließen lässt, dass postsynaptisches PRG-1 durch eine Interaktion mit Lipidphosphaten die Konzentration an diesen Lipiden im synaptischen Spalt vermindern könnte. Schließlich zeigte die IUE eines mutierten PRG-1 Proteins und die Verpaarung mit einer LPA₂ Rezeptor KO Maus die modulatorische Funktion von PRG-1 auf eine präsynaptische LPA₂ vermittelte Signaltransduktion. Ein Überblick des neu entwickelten Modells der Modulation der präsynaptischen LPA Signaltransduktion durch postsynaptisches PRG-1 ist in Abbildung 40 dargestellt.

Die Tatsache, dass 1. PRG-1 spezifisch auf Synapsen lokalisiert ist, die eine Erregung (Depolarisation) zu einer weiteren erregenden Zelle weiterleiten, und 2. dass Orthologe von PRG-1 ausschließlich in Vertebraten gefunden werden (NCBI Genbank), lässt vermuten, dass PRG-1 eventuell an höheren kognitiven Funktionen beteiligt sein könnte. Daher könnte vermutet werden, dass die physiologische Rolle von PRG-1 mit einer glutamaterger synaptischen Plastizität verbunden sein könnte. Die Stärke der synaptischen Transmission könnte zum Beispiel durch PRG-1 und eine LPA induzierten präsynaptischen Signaltransduktion aktiv reguliert werden. Durch Veränderungen der synaptischen Stärke in einer aktiven Art und Weise wird erklärt, dass Neurone und neuronale Netzwerke Informationen durch Lernen und Erinnern speichern können (Review: [128, 148]). Obwohl das Fehlen von PRG-1 zu einer generellen Erhöhung der synaptischen Transmission führte, kann dies nicht per se als Form für synaptische Plastizität angenommen werden. Im Rahmen von weiteren Experimenten, zum Beispiel durch die elektrophysiologische Induktion von LTP (Long Term Potentiation) [148] in PRG-1-KO Tieren, könnte gezeigt werden, ob PRG-1 einen Einfluss auf die synaptische Plastizität besitzt.

Des Weiteren ist es interessant, die postsynaptischen C-terminalen Interaktionspartner von PRG-1 zu identifizieren, um weitere Erkenntnisse zu erlangen, die erklären könnten, nach welchem Mechanismus PRG-1 die Lipid-Phosphatkonzentration im synaptischen Spalt regulieren könnte. Ebenso ist es wichtig die präsynaptische LPA Signalkaskade zu identifizieren, so dass die beobachtete höhere Transmitterfreisetzungswahrscheinlichkeit in PRG-1-KO Tieren besser erklärt werden könnte.

Das neuronale Protein PRG-1 stellt mit all diesen neuen Erkenntnissen ein faszinierendes Molekül dar, das über seine physiologische Rolle neue Aspekte der Regulation von neuronalen Signalübertragungen beschreibt, so dass weitere Forschungen an diesem Protein interessante neue Einblicke in die Funktion neuronaler Netzwerke bieten könnten.

E LITERATURVERZEICHNIS

1. Brauer, A.U., et al., *A new phospholipid phosphatase, PRG-1, is involved in axon growth and regenerative sprouting*. Nat Neurosci, 2003. **6**(6): p. 572-8.
2. Brauer, A.U. and R. Nitsch, *Plasticity-related genes (PRGs/LRPs): A brain-specific class of lysophospholipid-modifying proteins*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1781**(9): p. 595-600.
3. Brindley, D.N., *Lipid phosphate phosphatases and related proteins: signaling functions in development, cell division, and cancer*. J Cell Biochem, 2004. **92**(5): p. 900-12.
4. Sigal, Y.J., M.I. McDermott, and A.J. Morris, *Integral membrane lipid phosphatases/phosphotransferases: common structure and diverse functions*. Biochem J, 2005. **387**(Pt 2): p. 281-93.
5. Jasinska, R., et al., *Lipid phosphate phosphohydrolase-1 degrades exogenous glycerolipid and sphingolipid phosphate esters*. Biochem J, 1999. **340** (Pt 3): p. 677-86.
6. Brindley, D.N., et al., *Lipid phosphate phosphatases regulate signal transduction through glycerolipids and sphingolipids*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1582**(1-3): p. 33-44.
7. Zhang, Q.X., et al., *Identification of structurally important domains of lipid phosphate phosphatase-1: implications for its sites of action*. Biochem J, 2000. **345** Pt 2: p. 181-4.
8. Smith, S.W., S.B. Weiss, and E.P. Kennedy, *The enzymatic dephosphorylation of phosphatidic acids*. J Biol Chem, 1957. **228**(2): p. 915-22.
9. Martin, A., et al., *Characterization and assay of phosphatidate phosphatase*. Methods Enzymol, 1991. **197**: p. 553-63.
10. Cascales, C., E.H. Mangiapane, and D.N. Brindley, *Oleic acid promotes the activation and translocation of phosphatidate phosphohydrolase from the cytosol to particulate fractions of isolated rat hepatocytes*. Biochem J, 1984. **219**(3): p. 911-6.
11. Smith, M.E., et al., *The role of phosphatidate phosphohydrolase in glyceride biosynthesis*. Eur J Biochem, 1967. **3**(1): p. 70-7.
12. Martin, A., P. Hales, and D.N. Brindley, *A rapid assay for measuring the activity and the Mg²⁺ and Ca²⁺ requirements of phosphatidate phosphohydrolase in cytosolic and microsomal fractions of rat liver*. Biochem J, 1987. **245**(2): p. 347-55.
13. Reue, K. and D.N. Brindley, *Multiple roles for lipins/phosphatidate phosphatase enzymes in lipid metabolism*. J Lipid Res, 2008.
14. Han, G.S., W.I. Wu, and G.M. Carman, *The Saccharomyces cerevisiae Lipin homolog is a Mg²⁺-dependent phosphatidate phosphatase enzyme*. J Biol Chem, 2006. **281**(14): p. 9210-8.
15. Peterfy, M., et al., *Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 121-4.
16. Phan, J. and K. Reue, *Lipin, a lipodystrophy and obesity gene*. Cell Metab, 2005. **1**(1): p. 73-83.
17. Christie, W.W., M.L. Hunter, and R.G. Vernon, *Triacylglycerol biosynthesis in rat adipose-tissue homogenates*. Biochem J, 1976. **159**(3): p. 571-7.

18. Carman, G.M. and G.S. Han, *Roles of phosphatidate phosphatase enzymes in lipid metabolism*. Trends Biochem Sci, 2006. **31**(12): p. 694-9.
19. Jamal, Z., et al., *Plasma membrane fractions from rat liver contain a phosphatidate phosphohydrolase distinct from that in the endoplasmic reticulum and cytosol*. J Biol Chem, 1991. **266**(5): p. 2988-96.
20. Dillon, D.A., et al., *Mammalian Mg²⁺-independent phosphatidate phosphatase (PAP2) displays diacylglycerol pyrophosphate phosphatase activity*. J Biol Chem, 1997. **272**(16): p. 10361-6.
21. Brindley, D.N. and D.W. Waggoner, *Mammalian lipid phosphate phosphohydrolases*. J Biol Chem, 1998. **273**(38): p. 24281-4.
22. Kai, M., et al., *Identification and cDNA cloning of 35-kDa phosphatidic acid phosphatase (type 2) bound to plasma membranes. Polymerase chain reaction amplification of mouse H₂O₂-inducible hic53 clone yielded the cDNA encoding phosphatidic acid phosphatase*. J Biol Chem, 1996. **271**(31): p. 18931-8.
23. Kai, M., et al., *Cloning and characterization of two human isozymes of Mg²⁺-independent phosphatidic acid phosphatase*. J Biol Chem, 1997. **272**(39): p. 24572-8.
24. Roberts, R., V.A. Sciorra, and A.J. Morris, *Human type 2 phosphatidic acid phosphohydrolases. Substrate specificity of the type 2a, 2b, and 2c enzymes and cell surface activity of the 2a isoform*. J Biol Chem, 1998. **273**(34): p. 22059-67.
25. Hooks, S.B., S.P. Ragan, and K.R. Lynch, *Identification of a novel human phosphatidic acid phosphatase type 2 isoform*. FEBS Lett, 1998. **427**(2): p. 188-92.
26. Ishikawa, T., et al., *Cell surface activities of the human type 2b phosphatidic acid phosphatase*. J Biochem, 2000. **127**(4): p. 645-51.
27. Sciorra, V.A. and A.J. Morris, *Sequential actions of phospholipase D and phosphatidic acid phosphohydrolase 2b generate diglyceride in mammalian cells*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(11): p. 3863-76.
28. Nanjundan, M. and F. Possmayer, *Pulmonary lipid phosphate phosphohydrolase in plasma membrane signalling platforms*. Biochem J, 2001. **358**(Pt 3): p. 637-46.
29. Roberts, R.Z. and A.J. Morris, *Role of phosphatidic acid phosphatase 2a in uptake of extracellular lipid phosphate mediators*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1487**(1): p. 33-49.
30. Stuke, J. and G.M. Carman, *Identification of a novel phosphatase sequence motif*. Protein Sci, 1997. **6**(2): p. 469-72.
31. Hemrika, W., et al., *From phosphatases to vanadium peroxidases: a similar architecture of the active site*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(6): p. 2145-9.
32. Neuwald, A.F., *An unexpected structural relationship between integral membrane phosphatases and soluble haloperoxidases*. Protein Sci, 1997. **6**(8): p. 1764-7.
33. Icho, T. and C.R. Raetz, *Multiple genes for membrane-bound phosphatases in Escherichia coli and their action on phospholipid precursors*. J Bacteriol, 1983. **153**(2): p. 722-30.
34. Dillon, D.A., et al., *The Escherichia coli pgpB gene encodes for a diacylglycerol pyrophosphate phosphatase activity*. J Biol Chem, 1996. **271**(48): p. 30548-53.
35. Toke, D.A., et al., *Isolation and characterization of the Saccharomyces cerevisiae DPP1 gene encoding diacylglycerol pyrophosphate phosphatase*. J Biol Chem, 1998. **273**(6): p. 3278-84.
36. Mao, C., et al., *Identification and characterization of Saccharomyces cerevisiae*

- dihydrosphingosine-1-phosphate phosphatase*. J Biol Chem, 1997. **272**(45): p. 28690-4.
37. Mandala, S.M., et al., *Sphingoid base 1-phosphate phosphatase: a key regulator of sphingolipid metabolism and stress response*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(1): p. 150-5.
 38. Toke, D.A., et al., *Isolation and characterization of the Saccharomyces cerevisiae LPP1 gene encoding a Mg²⁺-independent phosphatidate phosphatase*. J Biol Chem, 1998. **273**(23): p. 14331-8.
 39. Simons, B.H., et al., *Primary structure and characterization of the vanadium chloroperoxidase from the fungus Curvularia inaequalis*. Eur J Biochem, 1995. **229**(2): p. 566-74.
 40. Lei, K.J., et al., *Structure-function analysis of human glucose-6-phosphatase, the enzyme deficient in glycogen storage disease type 1a*. J Biol Chem, 1995. **270**(20): p. 11882-6.
 41. Pan, C.J., et al., *Transmembrane topology of glucose-6-phosphatase*. J Biol Chem, 1998. **273**(11): p. 6144-8.
 42. Zhang, N., et al., *The Drosophila protein Wunen repels migrating germ cells*. Nature, 1997. **385**(6611): p. 64-7.
 43. Vogt, W., *The chemical nature of Darmstoff*. J Physiol, 1957. **137**(1): p. 154-67.
 44. Vogt, W., *Pharmacologically active lipidsoluble acids of natural occurrence*. Nature, 1957. **179**(4554): p. 300-4; passim.
 45. Vogt, W., *Pharmacologically active acidic phospholipids and glycolipids*. Biochem Pharmacol, 1963. **12**: p. 415-20.
 46. Schumacher, K.A., H.G. Classen, and M. Spath, *Platelet aggregation evoked in vitro and in vivo by phosphatidic acids and lysoderivatives: identity with substances in aged serum (DAS)*. Thromb Haemost, 1979. **42**(2): p. 631-40.
 47. Tokumura, A., et al., *Lysophosphatidic acid-induced aggregation of human and feline platelets: structure-activity relationship*. Biochem Biophys Res Commun, 1981. **99**(2): p. 391-8.
 48. van Corven, E.J., et al., *Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins*. Cell, 1989. **59**(1): p. 45-54.
 49. van der Bend, R.L., et al., *Identification of a putative membrane receptor for the bioactive phospholipid, lysophosphatidic acid*. Embo J, 1992. **11**(7): p. 2495-501.
 50. Hecht, J.H., et al., *Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex*. J Cell Biol, 1996. **135**(4): p. 1071-83.
 51. An, S., et al., *Characterization of a novel subtype of human G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid*. J Biol Chem, 1998. **273**(14): p. 7906-10.
 52. Contos, J.J. and J. Chun, *Complete cDNA sequence, genomic structure, and chromosomal localization of the LPA receptor gene, lpA1/vzg-1/Gpcr26*. Genomics, 1998. **51**(3): p. 364-78.
 53. Bandoh, K., et al., *Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid*. J Biol Chem, 1999. **274**(39): p. 27776-85.
 54. Im, D.S., et al., *Molecular cloning and characterization of a lysophosphatidic acid receptor, Edg-7, expressed in prostate*. Mol Pharmacol, 2000. **57**(4): p. 753-9.

55. Noguchi, K., S. Ishii, and T. Shimizu, *Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family*. J Biol Chem, 2003. **278**(28): p. 25600-6.
56. Kotarsky, K., et al., *Lysophosphatidic acid binds to and activates GPR92, a G protein-coupled receptor highly expressed in gastrointestinal lymphocytes*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. **318**(2): p. 619-28.
57. Lee, C.W., et al., *GPR92 as a new G12/13- and Gq-coupled lysophosphatidic acid receptor that increases cAMP, LPA5*. J Biol Chem, 2006. **281**(33): p. 23589-97.
58. Ishii, I., et al., *Lysophospholipid receptors: signaling and biology*. Annu Rev Biochem, 2004. **73**: p. 321-54.
59. Fukushima, N., et al., *Lysophospholipid receptors*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2001. **41**: p. 507-34.
60. Lummen, G., et al., *Identification of G protein-coupled receptors potently stimulating migration of human transitional-cell carcinoma cells*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1997. **356**(6): p. 769-76.
61. Balazs, L., et al., *Topical application of the phospholipid growth factor lysophosphatidic acid promotes wound healing in vivo*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2001. **280**(2): p. R466-72.
62. Sturm, A. and A.U. Dignass, *Modulation of gastrointestinal wound repair and inflammation by phospholipids*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1582**(1-3): p. 282-8.
63. Weiner, J.A. and J. Chun, *Schwann cell survival mediated by the signaling phospholipid lysophosphatidic acid*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(9): p. 5233-8.
64. Tigyi, G. and R. Miledi, *Lysophosphatidates bound to serum albumin activate membrane currents in Xenopus oocytes and neurite retraction in PC12 pheochromocytoma cells*. J Biol Chem, 1992. **267**(30): p. 21360-7.
65. Jalink, K., et al., *Lysophosphatidic acid induces neuronal shape changes via a novel, receptor-mediated signaling pathway: similarity to thrombin action*. Cell Growth Differ, 1993. **4**(4): p. 247-55.
66. Fukushima, N., et al., *Lysophosphatidic acid influences the morphology and motility of young, postmitotic cortical neurons*. Mol Cell Neurosci, 2002. **20**(2): p. 271-82.
67. Kingsbury, M.A., et al., *Non-proliferative effects of lysophosphatidic acid enhance cortical growth and folding*. Nat Neurosci, 2003. **6**(12): p. 1292-9.
68. Kingsbury, M.A., et al., *Genetics and cell biology of lysophosphatidic acid receptor-mediated signaling during cortical neurogenesis*. J Cell Biochem, 2004. **92**(5): p. 1004-12.
69. Moolenaar, W.H., *Bioactive lysophospholipids and their G protein-coupled receptors*. Exp Cell Res, 1999. **253**(1): p. 230-8.
70. Moolenaar, W.H., L.A. van Meeteren, and B.N. Giepmans, *The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling*. Bioessays, 2004. **26**(8): p. 870-81.
71. Anliker, B. and J. Chun, *Cell surface receptors in lysophospholipid signaling*. Semin Cell Dev Biol, 2004. **15**(5): p. 457-65.
72. Fukushima, N., Y. Kimura, and J. Chun, *A single receptor encoded by vzg-1/lpa1/edg-2 couples to G proteins and mediates multiple cellular responses to lysophosphatidic acid*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): p. 6151-6.
73. Ishii, I., et al., *Functional comparisons of the lysophosphatidic acid receptors, LP(A1)/VZG-1/EDG-2, LP(A2)/EDG-4, and LP(A3)/EDG-7 in neuronal cell lines*

- using a retrovirus expression system. *Mol Pharmacol*, 2000. **58**(5): p. 895-902.
74. Mills, G.B. and W.H. Moolenaar, *The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(8): p. 582-91.
 75. Van Leeuwen, F.N., et al., *Rac activation by lysophosphatidic acid LPA1 receptors through the guanine nucleotide exchange factor Tiam1*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(1): p. 400-6.
 76. Kranenburg, O. and W.H. Moolenaar, *Ras-MAP kinase signaling by lysophosphatidic acid and other G protein-coupled receptor agonists*. *Oncogene*, 2001. **20**(13): p. 1540-6.
 77. Kranenburg, O., et al., *Activation of RhoA by lysophosphatidic acid and Galpha12/13 subunits in neuronal cells: induction of neurite retraction*. *Mol Biol Cell*, 1999. **10**(6): p. 1851-7.
 78. Tokumura, A., et al., *Involvement of lysophospholipase D in the production of lysophosphatidic acid in rat plasma*. *Biochim Biophys Acta*, 1986. **875**(1): p. 31-8.
 79. Tokumura, A., et al., *Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(42): p. 39436-42.
 80. Stracke, M.L., et al., *Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(4): p. 2524-9.
 81. Bachner, D., et al., *Developmental expression analysis of murine autotaxin (ATX)*. *Mech Dev*, 1999. **84**(1-2): p. 121-5.
 82. van Meeteren, L.A. and W.H. Moolenaar, *Regulation and biological activities of the autotaxin-LPA axis*. *Prog Lipid Res*, 2007. **46**(2): p. 145-60.
 83. van Meeteren, L.A., et al., *Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development*. *Mol Cell Biol*, 2006. **26**(13): p. 5015-22.
 84. Tanaka, M., et al., *Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(35): p. 25822-30.
 85. Neidlinger, N.A., et al., *Hydrolysis of phosphatidylserine-exposing red blood cells by secretory phospholipase A2 generates lysophosphatidic acid and results in vascular dysfunction*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(2): p. 775-81.
 86. Eichholtz, T., et al., *The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets*. *Biochem J*, 1993. **291** (Pt 3): p. 677-80.
 87. Hama, K., et al., *Lysophosphatidic acid (LPA) receptors are activated differentially by biological fluids: possible role of LPA-binding proteins in activation of LPA receptors*. *FEBS Lett*, 2002. **523**(1-3): p. 187-92.
 88. Sugiura, T., et al., *Lysophosphatidic acid, a growth factor-like lipid, in the saliva*. *J Lipid Res*, 2002. **43**(12): p. 2049-55.
 89. Tokumura, A., et al., *Production of lysophosphatidic acids by lysophospholipase D in human follicular fluids of In vitro fertilization patients*. *Biol Reprod*, 1999. **61**(1): p. 195-9.
 90. Sato, K., et al., *Identification of autotaxin as a neurite retraction-inducing factor of PC12 cells in cerebrospinal fluid and its possible sources*. *J Neurochem*, 2005. **92**(4): p. 904-14.
 91. Tanyi, J.L., et al., *The human lipid phosphate phosphatase-3 decreases the growth, survival, and tumorigenesis of ovarian cancer cells: validation of the lysophosphatidic acid signaling cascade as a target for therapy in ovarian cancer*. *Cancer Res*, 2003.

- 63**(5): p. 1073-82.
92. Smyth, S.S., et al., *Lipid phosphate phosphatases regulate lysophosphatidic acid production and signaling in platelets: studies using chemical inhibitors of lipid phosphate phosphatase activity*. J Biol Chem, 2003. **278**(44): p. 43214-23.
 93. Leung, D.W., C.K. Tompkins, and T. White, *Molecular cloning of two alternatively spliced forms of human phosphatidic acid phosphatase cDNAs that are differentially expressed in normal and tumor cells*. DNA Cell Biol, 1998. **17**(4): p. 377-85.
 94. Zhang, N., J.P. Sundberg, and T. Gridley, *Mice mutant for Ppap2c, a homolog of the germ cell migration regulator wunen, are viable and fertile*. Genesis, 2000. **27**(4): p. 137-40.
 95. Yue, J., et al., *Mice with transgenic overexpression of lipid phosphate phosphatase-1 display multiple organotypic deficits without alteration in circulating lysophosphatidate level*. Cell Signal, 2004. **16**(3): p. 385-99.
 96. Escalante-Alcalde, D., et al., *The lipid phosphatase LPP3 regulates extra-embryonic vasculogenesis and axis patterning*. Development, 2003. **130**(19): p. 4623-37.
 97. Zeng, L., et al., *The mouse Fused locus encodes Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation*. Cell, 1997. **90**(1): p. 181-92.
 98. Zhang, N., et al., *Identification and genetic analysis of wunen, a gene guiding Drosophila melanogaster germ cell migration*. Genetics, 1996. **143**(3): p. 1231-41.
 99. Starz-Gaiano, M., et al., *Spatially restricted activity of a Drosophila lipid phosphatase guides migrating germ cells*. Development, 2001. **128**(6): p. 983-91.
 100. Renault, A.D., et al., *Soma-germ line competition for lipid phosphate uptake regulates germ cell migration and survival*. Science, 2004. **305**(5692): p. 1963-6.
 101. McDermott, M.I., et al., *Is PRG-1 a new lipid phosphatase?* Nat Neurosci, 2004. **7**(8): p. 789; author reply 789-90.
 102. Liu, P., N.A. Jenkins, and N.G. Copeland, *A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations*. Genome Res, 2003. **13**(3): p. 476-84.
 103. Davies, B., et al., *Targeted deletion of the epididymal receptor HE6 results in fluid dysregulation and male infertility*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(19): p. 8642-8.
 104. Kawachi, T., et al., *The in vivo roles of STEF/Tiam1, Rac1 and JNK in cortical neuronal migration*. Embo J, 2003. **22**(16): p. 4190-201.
 105. Feinberg, A.P. and B. Vogelstein, *A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity*. Anal Biochem, 1983. **132**(1): p. 6-13.
 106. Church, G.M. and W. Gilbert, *Genomic sequencing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(7): p. 1991-5.
 107. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.
 108. Brandt, N., et al., *The neural EGF family member CALEB/NGC mediates dendritic tree and spine complexity*. Embo J, 2007. **26**(9): p. 2371-86.
 109. Timm, F., *[Histochemistry of heavy metals; the sulfide-silver procedure.]*. Dtsch Z Gesamte Gerichl Med, 1958. **46**(5): p. 706-11.
 110. Ben-Ari, Y., *Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy*. Neuroscience, 1985. **14**(2): p. 375-403.

111. McLin, J.P. and O. Steward, *Comparison of seizure phenotype and neurodegeneration induced by systemic kainic acid in inbred, outbred, and hybrid mouse strains*. Eur J Neurosci, 2006. **24**(8): p. 2191-202.
112. Schaft, J., et al., *Efficient FLP recombination in mouse ES cells and oocytes*. Genesis, 2001. **31**(1): p. 6-10.
113. Schwenk, F., et al., *Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**(6): p. 1427-32.
114. Mountford, P.S. and A.G. Smith, *Internal ribosome entry sites and dicistronic RNAs in mammalian transgenesis*. Trends Genet, 1995. **11**(5): p. 179-84.
115. Mullen, R.J., C.R. Buck, and A.M. Smith, *NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates*. Development, 1992. **116**(1): p. 201-11.
116. Nitsch, R., E. Soriano, and M. Frotscher, *The parvalbumin-containing nonpyramidal neurons in the rat hippocampus*. Anat Embryol (Berl), 1990. **181**(5): p. 413-25.
117. Ben-Ari, Y., *Cell death and synaptic reorganizations produced by seizures*. Epilepsia, 2001. **42 Suppl 3**: p. 5-7.
118. Sloviter, R.S., et al., *Kainic acid-induced recurrent mossy fiber innervation of dentate gyrus inhibitory interneurons: possible anatomical substrate of granule cell hyperinhibition in chronically epileptic rats*. J Comp Neurol, 2006. **494**(6): p. 944-60.
119. Sutula, T.P., J.E. Cavazos, and A.R. Woodard, *Long-term structural and functional alterations induced in the hippocampus by kindling: implications for memory dysfunction and the development of epilepsy*. Hippocampus, 1994. **4**(3): p. 254-8.
120. Khurgel, M. and G.O. Ivy, *Astrocytes in kindling: relevance to epileptogenesis*. Epilepsy Res, 1996. **26**(1): p. 163-75.
121. Sloviter, R.S., et al., *"Dormant basket cell" hypothesis revisited: relative vulnerabilities of dentate gyrus mossy cells and inhibitory interneurons after hippocampal status epilepticus in the rat*. J Comp Neurol, 2003. **459**(1): p. 44-76.
122. Prozorovski, T., et al., *Sirt1 contributes critically to the redox-dependent fate of neural progenitors*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(4): p. 385-94.
123. Niwa, H., K. Yamamura, and J. Miyazaki, *Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector*. Gene, 1991. **108**(2): p. 193-9.
124. Saito, T. and N. Nakatsuji, *Efficient gene transfer into the embryonic mouse brain using in vivo electroporation*. Dev Biol, 2001. **240**(1): p. 237-46.
125. Contos, J.J., et al., *Characterization of lpa(2) (Edg4) and lpa(1)/lpa(2) (Edg2/Edg4) lysophosphatidic acid receptor knockout mice: signaling deficits without obvious phenotypic abnormality attributable to lpa(2)*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(19): p. 6921-9.
126. Hasty, P., J. Rivera-Perez, and A. Bradley, *The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(11): p. 5586-91.
127. Yagi, T., et al., *A novel negative selection for homologous recombinants using diphtheria toxin A fragment gene*. Anal Biochem, 1993. **214**(1): p. 77-86.
128. Sheng, M. and C.C. Hoogenraad, *The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view*. Annu Rev Biochem, 2007. **76**: p. 823-47.
129. Mayer, M.L. and G.L. Westbrook, *The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system*. Prog Neurobiol, 1987. **28**(3): p. 197-276.
130. Collingridge, G.L. and R.A. Lester, *Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system*. Pharmacol Rev, 1989. **41**(2): p. 143-210.
131. Moss, S.J. and T.G. Smart, *Constructing inhibitory synapses*. Nat Rev Neurosci,

2001. **2**(4): p. 240-50.
132. Sivilotti, L. and A. Nistri, *GABA receptor mechanisms in the central nervous system*. Prog Neurobiol, 1991. **36**(1): p. 35-92.
133. Wouterlood, F.G., T. Bockers, and M.P. Witter, *Synaptic contacts between identified neurons visualized in the confocal laser scanning microscope. Neuroanatomical tracing combined with immunofluorescence detection of post-synaptic density proteins and target neuron-markers*. J Neurosci Methods, 2003. **128**(1-2): p. 129-42.
134. Brakeman, P.R., et al., *Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors*. Nature, 1997. **386**(6622): p. 284-8.
135. Sassoe-Pognetto, M. and J.M. Fritschy, *Mini-review: gephyrin, a major postsynaptic protein of GABAergic synapses*. Eur J Neurosci, 2000. **12**(7): p. 2205-10.
136. Moshe, S.L., et al., *Increased seizure susceptibility of the immature brain*. Brain Res, 1983. **283**(1): p. 81-5.
137. Holmes, G.L. and Y. Ben-Ari, *Seizures in the developing brain: perhaps not so benign after all*. Neuron, 1998. **21**(6): p. 1231-4.
138. Ben-Ari, Y., *Basic developmental rules and their implications for epilepsy in the immature brain*. Epileptic Disord, 2006. **8**(2): p. 91-102.
139. Rivera, C., et al., *The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation*. Nature, 1999. **397**(6716): p. 251-5.
140. Ben-Ari, Y., et al., *GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations*. Physiol Rev, 2007. **87**(4): p. 1215-84.
141. Wolf, H.K., et al., *NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology*. J Histochem Cytochem, 1996. **44**(10): p. 1167-71.
142. Atwood, H.L. and S. Karunanithi, *Diversification of synaptic strength: presynaptic elements*. Nat Rev Neurosci, 2002. **3**(7): p. 497-516.
143. Navarro-Quiroga, I., et al., *Long-term, selective gene expression in developing and adult hippocampal pyramidal neurons using focal in utero electroporation*. J Neurosci, 2007. **27**(19): p. 5007-11.
144. Contos, J.J., I. Ishii, and J. Chun, *Lysophosphatidic acid receptors*. Mol Pharmacol, 2000. **58**(6): p. 1188-96.
145. Kondrashov, F.A. and E.V. Koonin, *A common framework for understanding the origin of genetic dominance and evolutionary fates of gene duplications*. Trends Genet, 2004. **20**(7): p. 287-90.
146. Todd, A.E., C.A. Orengo, and J.M. Thornton, *Sequence and structural differences between enzyme and nonenzyme homologs*. Structure, 2002. **10**(10): p. 1435-51.
147. Savaskan, N.E., et al., *Autotaxin (NPP-2) in the brain: cell type-specific expression and regulation during development and after neurotrauma*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(2): p. 230-43.
148. Malenka, R.C. and M.F. Bear, *LTP and LTD: an embarrassment of riches*. Neuron, 2004. **44**(1): p. 5-21.

F ANHANG

F.1 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfen und Hilfsmittel angefertigt habe. Ich habe mich außerdem weder anderwärts um einen Doktorgrad beworben noch besitze ich bereits einen entsprechenden Doktorgrad. Die dem angestrebten Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Berlin, den _____

F.2 Publikationen und Posterpräsentationen

F.2.1 Publikationen

McGurk L, Pathirana S, Rothwell K, **Trimbuch T**, Colombini P, Yu F, Chia W, and Bownes M (2008). The RGS gene loco is essential for male reproductive system differentiation in *Drosophila melanogaster*. *BMC Dev Biol* 8, 37.

Lehnardt S, Schott E, **Trimbuch T**, Laubisch D, Krueger C, Wulczyn G, Nitsch R, and Weber JR (2008). A vicious cycle involving release of heat shock protein 60 from injured cells and activation of toll-like receptor 4 mediates neurodegeneration in the CNS. *J Neurosci* 28, 2320-2331.

Johanning FW, Beed P, **Trimbuch T**, Bendels M, and Schmitz D (2009). Dendritic excitability and cellular output mode determine pathway specific LTP in the anterior piriform cortex. In Überarbeitung.

Rupprecht A, Beck V, Ninnemann O, Jaburek M, **Trimbuch T**, Klishin SS, Jezek P, Nitsch R, Skulachev VP, and Pohl EE (2009). Role of the transmembrane potential in the mitochondrial membrane proton leak. In Überarbeitung.

Trimbuch T, Beed P, Vogt J, Schuchmann S, Maier N, Kintscher M, Breustedt J, Schuelke-Gerstenfeld M, Streu N, Kieselmann O, Brunk I, Laube G, Strauss U, Battfeld A, Wende H, Birchmeier C, Wiese S, Sendtner M, Kawabe H, Kishimoto-Suga M, Brose N, Baumgart J, Geist B, Aoki J, Savaskan NE, Bräuer AU, Chun J, Ninnemann O, Schmitz D, and Nitsch R (2009). PRG-1 is a novel player at the synapse, modulating excitatory transmission via lipid phosphate-mediated signaling. In Überarbeitung.

F.2.2 Konferenzbeiträge durch Posterpräsentationen

Trimbuch T, Geist B, Ninnemann O, Nitsch R. Generation of conditional KO-mice for PRG-1 and PRG-2 using Red recombination technology. Berlin Neuroscience Forum (BNF). 8. - 10. Juni 2006, Liebenwalde, Deutschland.

Trimbuch T, Krulev S, Vogt J, Ninnemann O, Nitsch R. Generation and analysis of PRG-1 KO Mice. FASEB Summer Research Conference: Lysophospholipid Mediators in Health and Disease. 9. - 14. Juni 2007, Tuscon AZ, U.S.A..

Trimbuch T, Beed P, Vogt J, Ninnemann O, Schuchmann S, Schuelke M, Baumgart J, Streu N, Geist B, Schlueter L, Meier N, Brunk I, Ahnert-Hilger G, Birchmeier C, Sendtner M, Braeuer AU, Schmitz D and Nitsch R. Role of PRG-1 in hippocampal excitability and epilepsy. 6th FENS forum of european neuroscience. 12. - 16. Juli 2008, Genf, Schweiz.

F.4 Danksagung

Ich danke zu allererst Prof. Dr. Robert Nitsch, der mir die Möglichkeit eröffnete, an seinem Institut mit diesem Thema zum Dr. rer. nat. zu promovieren. Trotz einiger Durststrecken auf dem Weg zur fertigen KO Maus glaubte er immer an meine Arbeit und motivierte mich.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Olaf Ninnemann, der mich als Supervisor hervorragend betreut, mich in die Welt der LPPs und PRGs eingeführt hat und bei Problemen, sei es in der Molekularbiologie oder auch in alltäglichen Dingen immer ein sehr guter Ansprechpartner war.

Vielen Dank auch an Dr. Johannes Vogt, der mir in dem letzten Teil meiner Arbeit, der morphologischen Phänotypisierung der Maus, durch seine anatomische, morphologische und histologische Expertise mit vielerlei Rat zur Seite stand.

An alle Kooperationspartner, ohne die diese Arbeit nie zustande gekommen wäre, geht mein herzlicher Dank. Für die Hilfe bei der Generierung der verschiedenen Mäuse danke ich Dr. Bettina Holtmann und Dr. Stefan Wiese in Würzburg, Dr. Hagen Wende, Dr. Elvira Rohde und Katja Becker in Berlin Buch. Für die Hilfe der elektrophysiologischen Phänotypisierung danke ich der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dietmar Schmitz. Hierbei gilt jedoch mein ganz besonderer Dank Dr. Sebastian Schuchmann für die EEG Messungen und Prateep Beed für die vielen *in vitro* Messungen und elektrophysiologischen Erklärungen. Dank auch an Dietmar, der für viele Fragen immer Zeit gefunden hat und sich bereit erklärt hat, das Zweitgutachten zu übernehmen.

Durch ihre Gespräche, Kaffeepausen und vielen Hilfen möchte ich mich auch bei allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der AG Nitsch bedanken. Dazu zählen (in alphabetischer Reihenfolge) Jan Baumgart, Luca Coiro, Beate Geist, Sergey Krulev, Denis Lajkó, Luise Richter, Katja Rösler, Leslie Schlüter, Nora Streu und Brita Vorwerk. Dabei geht mein besonderer Dank an Denis, der mir eine sehr große Hilfe bei der Bewältigung der täglichen Laborarbeit war. Weiterhin möchte ich Nora für ihre Hilfe bei der mikroskopischen Auswertung der Färbungen und Jan für dessen unermüdlichen Einsatz bei den *in utero* Elektroporationen danken.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Zell- und Neurobiologie möchte ich mich für die nette Arbeitsatmosphäre bedanken. Dabei möchte ich mich insbesondere bei denen bedanken, die mir gezeigt haben, dass es auch noch ein Leben neben dem Labor gibt. Vielen Dank an Bettina, Rike, Lena, Greta, Miriam, Leslie, Brita, Peggy, Olga, Tanja, Sascha, Kristin, Wolfgang, Nikola, Jan, Heiko, Agnieszka, Anna, Benjamin und Prateep.

Vielen Dank auch an all meine nicht genannten Freunde jenseits der Arbeit, die mich in den

letzten Jahren immer wieder motiviert haben und denen die Geschichten über meine Bakterienklone und Mäuse nie langweilig wurden.

Für das Korrekturlesen der Arbeit möchte ich mich noch einmal besonders bedanken bei Olaf und Sebastian und als dritten Leser, fern ab von der naturwissenschaftlichen Welt, bei Friederike.

Zu guter Letzt gilt ein großes Dankeschön meinen Eltern und meiner Freundin Franziska, für ihre anhaltende Unterstützung und Motivation bei dem großen Projekt „Promotion“.