

3.2.7.2. Untersuchungen zur Permissivität von mNTRA im Streifenassay

Der Streifenassay wurde ursprünglich zur Untersuchung axonaler Leitmoleküle des retinotektalen Systems entwickelt (Walter et al., 1987). Dieses *in vitro* Testsystem bietet die Möglichkeit das Wachstumsverhalten von Neuriten, gegenüber zwei simultan angebotenen Substraten zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Permissivität von CHO Zellmembranen gegenüber hippokampalen Explantaten aus E20 Rattenembryonen getestet.

Die Zellmembranen wurden aus CHO Zellen präpariert, die zuvor mit dem Konstrukt pcDNA3-mNTRA und als Kontrolle nur mit dem Vektor pcDNA3 stabil transfiziert wurden. Die Membranfraktionen der selektierten Zellen wurden im Western Blot mit Antikörpern gegen mNTRA getestet (Abb. 24A). Eine deutliche Bande von etwa 50 kD wird in CHO Zellen erkannt, die mit pcDNA3-mNTRA transfiziert wurden. In CHO Zellen, die nur mit dem Plasmid pcDNA3 transfiziert wurden, wird eine schwache Doppelbande gleicher Größe detektiert. Hierbei könnte es sich um eine schwache, endogene Expression von mNTRA handeln. Zusätzlich wurde Zellhomogenisat der beiden stabil transfizierten CHO Zelllinien, vor Isolierung der Membranfraktionen, mit Antikörpern gegen β -Actin im Western Blot getestet. Gleiche Mengen β -Actin wurden in beiden Zelllinien detektiert (Abb. 24B).

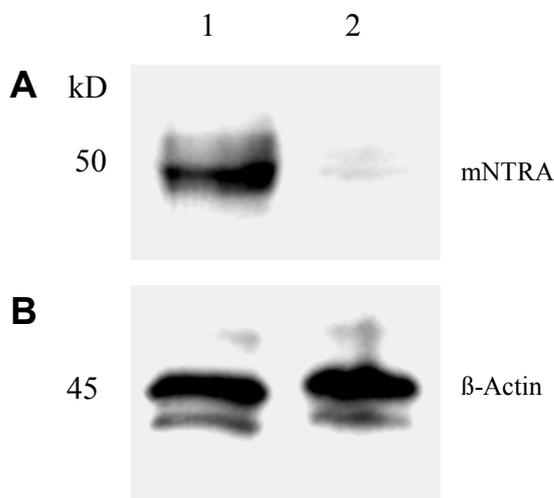


Abbildung 24: Überprüfung der Proteinexpression stabil transfizierter CHO Zellen.

A) Membranfraktionen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Antikörpern gegen mNTRA detektiert. B) Zellhomogenisate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Antikörpern gegen β -Actin detektiert (Spur 1: CHO Zellen + pcDNA3-mNTRA; Spur 2: CHO Zellen - pcDNA3).

3.2.7.3. Untersuchungen zur permissiven Wirkung von mNTRA im Vergleich zu PLL / Kollagen

Zunächst wurde der Neuritenauswuchs hippocampaler Explantate aus E20 Embryonen der Ratte auf Nucleopore Filter getestet, auf denen entweder CHO-Membranen + mNTRA oder CHO-Membranen – mNTRA ausgebracht wurden. Dadurch wurde die Permissivität der Neuriten gegenüber PLL / Kollagen getestet, mit denen alle Nucleopore Filter präinkubiert wurden. Wurde den Explantaten die Wahl zwischen CHO-Membranen – mNTRA und PLL / Kollagen vorgegeben, zeigten diese für keines der beiden Substrate eine deutliche Auswachspräferenz. Die Abbildungen 25A + B zeigen hierfür ein repräsentatives Beispiel. Die Pfeile deuten auf faszikulierte Neuriten, die ein ungerichtetes Wachstum aufweisen und dabei parallel zum Explantat beide Substrate überqueren. Dies wurde als ein Kriterium für ein zufälliges Auswachsen determiniert. Explantate, die vorrangig ein solches Auswachsverhalten zeigten, wurden unter „keine Präferenz“ (k.P.) eingeordnet. Die Ergebnisse wurden in einem Balkendiagramm zusammengefasst (Abb. 25C).

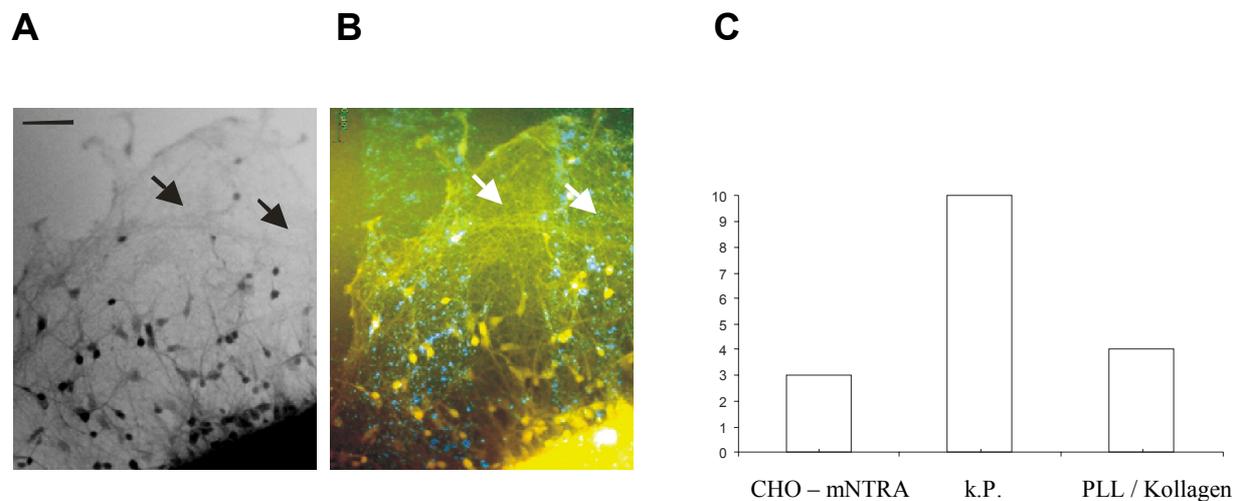


Abbildung 25: Wachstumsverhalten hippocampaler Explantate, denen die Wahl zwischen CHO-Membranen – mNTRA und PLL / Kollagen vorgegeben wurde. A) Invertierte Aufnahme auswachsender hippocampaler Explantate. B) Überlagerte Fluoreszenzaufnahme auswachsender hippocampaler Explantate. CHO-Membranen – mNTRA wurden zur Visualisierung mit blau fluoreszierenden Kügelchen versetzt. Die Pfeile in den beiden Abbildungen deuten den Verlauf von Neuriten an, die keine Präferenz für eines der beiden Substrate aufweisen (k.P.). Der Balken entspricht 50 μ m. C) Balkendiagramm zur Darstellung der Auswachspräferenz untersuchter Explantate. Auf der vertikalen Achse wurde die Anzahl der Explantate aufgetragen. Die horizontale Achse kennzeichnet den Präferenztyp.

3.2.7.4. Untersuchungen zur permissiven Wirkung von CHO-Membranen + mNTRA im Vergleich zu CHO-Membranen – mNTRA

Als nächstes wurden CHO-Membranen + mNTRA gegenüber PLL / Kollagen als Substrat angeboten. In Abbildung 26A ist ein Beispiel für ein Explantat dargestellt, dass präferentiell auf CHO + mNTRA auswächst. Die schwarzen Pfeile deuten auf Neuriten, die zuerst an der Grenze der beiden Substrate auswachsen und dann ihr Wachstum auf CHO + mNTRA fortsetzen. Der weiße Pfeil (Abb. 26B) deutet auf Neuriten, die die CHO-Membranen + mNTRA verlassen, den Streifen mit PLL / Kollagen diagonal überqueren, und wiederum auf dem mNTRA-haltigen Substrat ihr Wachstum fortsetzen. Das Balkendiagramm in Abbildung 26C fasst die Ergebnisse für das Wachstumsverhalten der beiden Explantate zusammen, die eine Wahl zwischen CHO + mNTRA und PLL / Kollagen hatten. Die meisten Explantate zeigten keine Präferenz für das Auswachsen auf einem der beiden Substrate (8 von 15). Für CHO-Membranen + mNTRA wird in diesem Experiment eine Präferenz bei 6 von 15 Explantaten beobachtet. Nur ein Explantat wächst präferentiell auf PLL / Kollagen aus. Demnach bevorzugen auswachsende Neuriten CHO-Membranen + mNTRA gegenüber PLL / Kollagen.

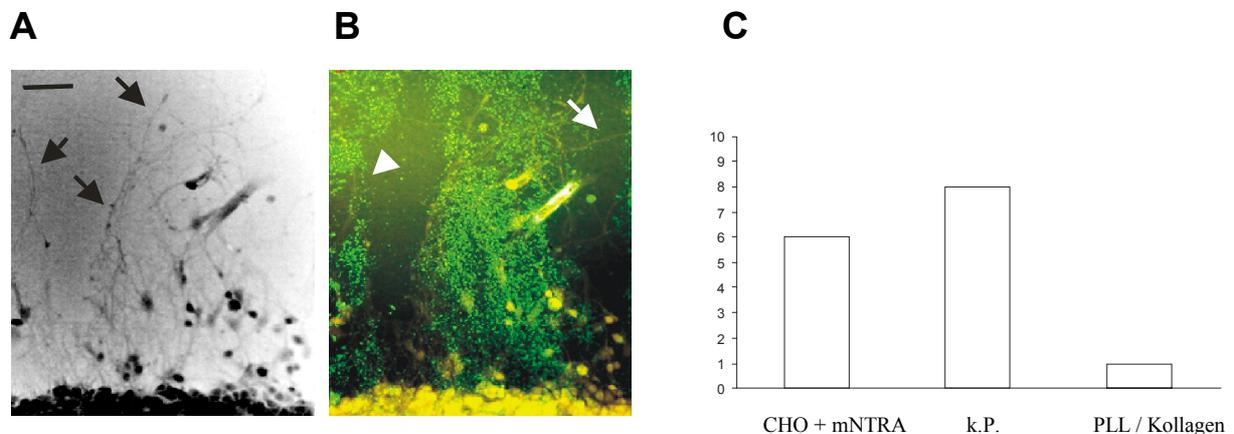


Abbildung 26: Wachstumsverhalten hippocampaler Explantate, denen die Wahl zwischen CHO-Membranen + mNTRA und PLL / Kollagen vorgegeben wurde. A) Invertierte Aufnahme auswachsender hippocampaler Explantate. Die schwarzen Pfeile deuten den Wachstumsverlauf von Neuriten an, die präferentiell auf CHO-Membranen + mNTRA auswachsen. B) Überlagerte Fluoreszenzaufnahme auswachsender hippocampaler Explantate. CHO-Membranen + mNTRA wurden zur Visualisierung mit grün fluoreszierenden Kügelchen versetzt. Der weiße Pfeil markiert ein Neurit, das diagonal das Substrat PLL / Kollagen überquert, ohne eine Präferenz für dieses Substrat durch eine Richtungsänderung des Wachstums zu zeigen. Dagegen weist die Pfeilspitze auf ein Neurit, das eine Präferenz für CHO-Membranen + mNTRA aufweist. Der Balken entspricht 50 μm . C) Balkendiagramm zur Darstellung der Auswachspräferenz untersuchter Explantate. Auf der vertikalen Achse wurde die Anzahl der Explantate aufgetragen. Die horizontale Achse kennzeichnet den Präferenztyp.

Die bisherigen Ergebnisse wiesen auf eine attraktive Wirkung von CHO-Membranen + mNTRA auf auswachsende Explantate im Vergleich zu PLL / Kollagen hin. Im folgenden Versuch wurden CHO-Membranen + mNTRA in alternierenden Streifen zu CHO-Membranen – mNTRA angeboten und die Auswachspräferenz hippokampaler Explantate auf diesen Substraten verglichen. Hierbei wurde eine deutliche Präferenz auswachsender Neuriten für CHO-Membranen + mNTRA ermittelt. Dabei fallen insbesondere die Neuritenbündel auf, die bevorzugt auf CHO-Membranen + mNTRA aussprossen (Abb. 27A + C). Mit zunehmenden Längenwachstum und dementsprechender Entfernung vom Explantat wurde häufig ein Verlust der Präferenz für CHO-Membranen + mNTRA festgestellt (Abb. 27D). Eine Begründung für diese Beobachtung könnte in einer zeitabhängigen Abnahme der Aktivität von mNTRA liegen. Die Auswachspräferenz der Explantate in diesem Experiment sind als Balkendiagramm dargestellt (Abb. 27E). In Tabelle 6 wurden die Ergebnisse der Experimente zusammengefasst.

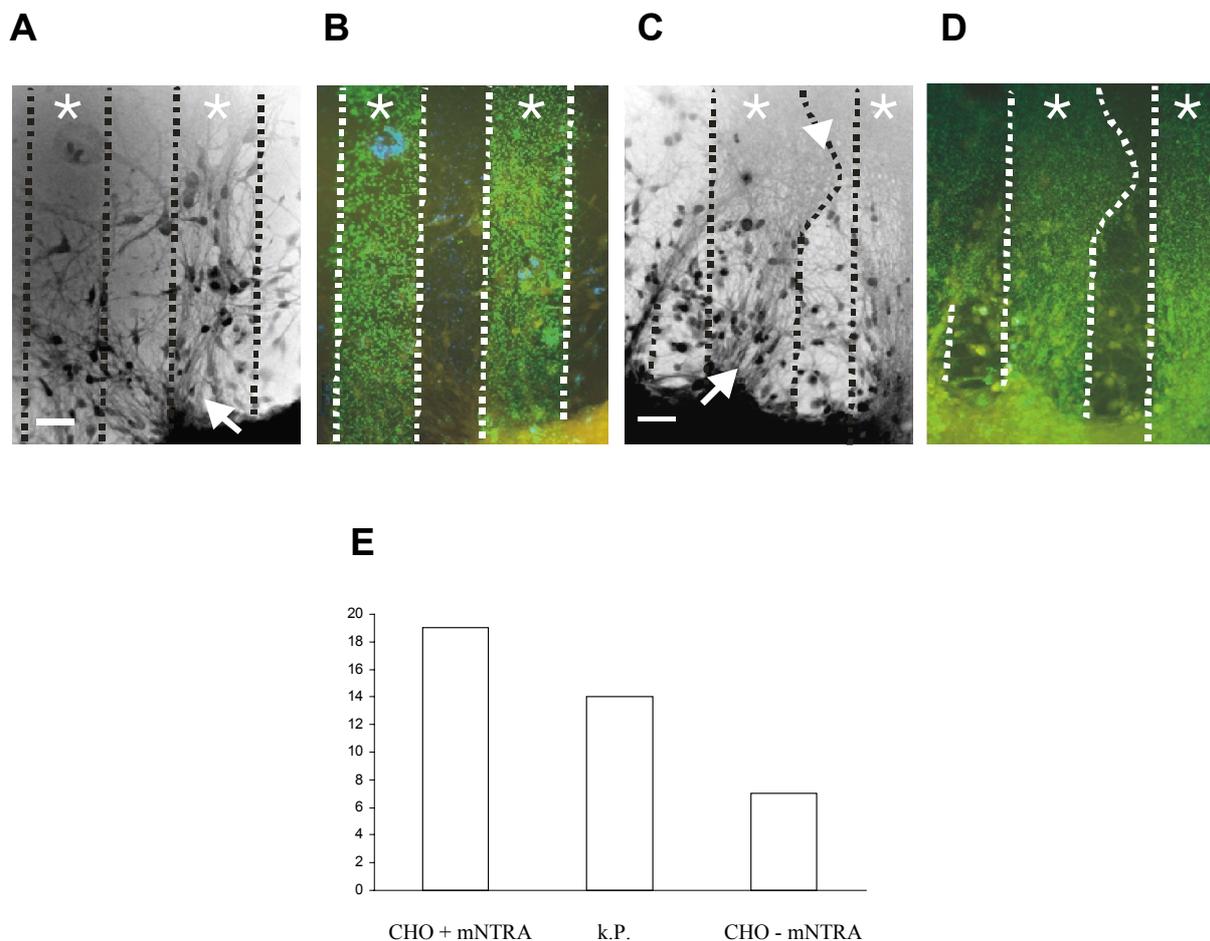


Abbildung 27: Streifenassay zur Untersuchung der Permissivität von mNTRA gegenüber hippokampalen Explantaten. A) + C) Invertierte Aufnahme auswachsender hippokampaler Explantate. Die in diesen Aufnahmen nicht sichtbaren Streifen wurden durch punktierte Linien der Substratgrenzen angedeutet. CHO-Membranen + mNTRA sind mit einem Stern gekennzeichnet. Dabei bevorzugen aus den Explantaten auswachsende

3. Ergebnisse

Neuritenbündel CHO-Membranen + mNTRA (Pfeile). Mit zunehmenden Längenwachstum und dementsprechender Entfernung vom Explantat wurde häufig ein Verlust der Präferenz festgestellt. (Pfeilspitze). B) + D) Überlagerte Fluoreszenzaufnahme zur Darstellung der in Streifen angebotenen Membranfraktionen. Diese wurden mit fluoreszierenden Kügelchen versetzt. CHO-Membranen + mNTRA sind mit einem Stern gekennzeichnet. E) Balkendiagramm zur Darstellung der Auswachspräferenz untersuchter Explantate. Auf der vertikalen Achse wurde die Anzahl der Explantate aufgetragen. Die horizontale Achse kennzeichnet den jeweiligen Präferenztyp. Die Balken entsprechen 50 µm.

	Anzahl der Explantate	Keine Präferenz (k.P.)	Präferenz für CHO + mNTRA	Präferenz für CHO – mNTRA	Präferenz für PLL / Kollagen	Signifikanz
CHO + mNTRA gegen PLL / Kollagen	15	8	6	—	1	0,0281*
CHO - mNTRA gegen PLL / Kollagen	17	10	—	3	4	0,0231*
CHO + mNTRA gegen CHO - mNTRA	40	14	19	7	—	0,0039**

Tab. 6: Statistische Auswertung der Auswachspräferenzen. Es wurden für jedes Experiment die Anzahl der untersuchten Explantate und die Signifikanz der ermittelten Präferenzen dargestellt. Die Signifikanz wurde mit dem chi-Quadrat Test berechnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0001$).

Zusammenfassend konnte mit diesem *in vitro* Testsystem eine attraktive Wirkung von mNTRA auf das Auswachsverhalten hippokampaler Explantate aus E20 Rattenembryonen nachgewiesen werden. Dabei wird eine signifikante Präferenz der auswachsenden Neuritenbündel für CHO-Membranen + mNTRA gegenüber anderen Substraten beobachtet.