

**Aus dem Institut für Mikroskopische Anatomie und Neurobiologie
des Fachbereichs Humanmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz**

eingereicht über

**das Institut für Veterinär-Anatomie
des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin**

**Etablierung der *In-utero*-Elektroporation des
zentralen Nervensystems im Mausmodell C57BL/6**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Veterinärmedizin

an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jan Baumgart
Tierarzt
aus Frankfurt (Oder)

Berlin 2015
Journalnummer: 3535

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. J. Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. J. Plendl
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. R. Nitsch
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. A. Gruber

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

mice, inbred strains, animal models, uterus, embryonic development, central nervous system, transfection, electroporation, phosphatidic acids, phosphatidic phosphatase, neurogenesis (MeSH)

Tag der Promotion: 01.12.2015

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-681-4

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2015

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2015

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
A Einleitung und Ziele der Arbeit	01
B Literaturübersicht	03
B.1 Die Technik der <i>In-utero</i> -Elektroporation	03
B.1.1 Validierung der Technik	05
B.2 Die Entstehung des Gehirns	06
B.2.1 Der Isokortex	07
B.2.2 Der Allokortex	08
B.3 Die Entstehung des neuronalen Netzwerks	09
B.3.1 Zelluläre Migration im zentralen Nervensystem	10
B.3.2 Differenzierung und Verschaltung im zentralen Nervensystem	12
B.4 Die Molekularbiologie der Lipid Phosphatasen/Phosphotransferasen (LPT)	12
B.4.1 Plastizität-assoziiertes Gen (PRG), eine nicht aktive Phosphatase	13
B.4.1.1 Plastizität-assoziiertes Gen 1	13
B.4.2 Lipid Phosphat Phosphatase (LPP), eine aktive Phosphatase.....	14
B.4.2.1 Lipid Phosphat Phosphatase 1 und Lipid Phosphat Phosphatase 1a	15
C Tiere, Materialien und Methoden	17
C.1 Tiere	17
C.1.1 Gesetzlicher Rahmen	17
C.1.2 Versuchstiere	18
C.2 Materialien	22
C.2.1 Geräte und Programme	22
C.2.2 Plasmide	24
C.2.3 Bakterien, Wachstumsmedien, Antibiotika	27
C.2.4 Weitere Puffer und Lösungen.....	28
C.2.5 PCR-Analyse gentechnisch veränderter Tierstämme	29
C.2.6 Antikörper	30
C.2.7 Fertigsets.....	31
C.3 Methoden.....	31
C.3.1 Methode der <i>In-utero</i> -Elektroporation	31
C.3.2 Perfusionsfixierung	35
C.3.3 Molekularbiologische Arbeiten.....	36
C.3.3.1 Genotypisierung der PRG-1-ko und PRG-1-cko Mäuse.....	36
C.3.3.2 Restriktionsverdau.....	38
C.3.3.3 Gel-Elektrophorese.....	38

C.3.3.4	Konzentrationsbestimmung von DNS-Abschnitten und Plasmiden.....	39
C.3.3.5	Plasmid-Transformation in <i>E. coli</i> und Gewinnung einer Bakterienbouillon	39
C.3.3.6	Plasmidpräparation.....	40
C.3.4	Histologie und Immunohistologie	41
C.3.4.1	Gewebeschnitte.....	41
C.3.4.2	X-Gal Färbung von Gewebeschnitten	42
C.3.4.3	Fluoreszenzmarkierung von Gewebeschnitten	42
C.3.4.4	DAPI Färbung.....	43
C.3.4.5	Mikroskopie	43
C.3.4.5.1	Auswertungsschema zentralnervöser Transfektionsregionen.....	44
C.3.4.5.2	Histogrammanalyse und Zellkörperauszählung	45
C.3.5	Zellbiologische Methoden.....	48
C.3.5.1	Lipid-vermittelte Transfektion	48
C.3.6	Statistische Analysen	49
D	Eigene Untersuchungen und Ergebnisse	51
D.1	Etablierung der <i>In-utero</i> -Elektroporationstechnik mit C57BL/6-Mäusen	51
D.1.1	Elektroporationseffizienz	51
D.1.2	Plasmidtransfektionen	55
D.1.2.1	Plasmidtransfektion <i>in vitro</i> (HEK293-Zellen).....	55
D.1.2.2	Plasmidtransfektion <i>in vivo</i> (C57BL/6-Maus).....	56
D.1.2.3	Fluoreszenzsignalstärke transfizierter Plasmide <i>in vivo</i>	57
D.1.2.4	Expressionsbeginn fluoreszierender Proteine <i>in vivo</i>	58
D.1.2.5	Expressionsverlauf fluoreszierender Proteine <i>in vivo</i>	60
D.1.2.6	Einfluss der Plasmidtransfektion <i>in vivo</i> (C57BL/6-Maus).....	61
D.1.2.7	Spannungsabhängige Plasmidtransfektion <i>in vivo</i> (C57BL/6-Maus).....	62
D.1.2.8	Einfluss der Operationszeit.....	63
D.1.2.9	Transfektionen mehrerer Plasmide <i>in vivo</i> (C57BL/6-Maus).....	65
D.1.2.9.1	Doppeltransfektion.....	65
D.1.2.9.2	Doppeltransfektion in der gleichen Großhirnhemisphäre	70
D.1.2.9.3	Doppeltransfektion in den unterschiedlichen Großhirnhemisphären.....	72
D.1.3	Modifikation der Zusammensetzung von Zellbestandteilen <i>in vivo</i>	74
D.1.3.1	Direktes Nachweisverfahren einer erfolgreichen Transfektion	74
D.1.3.2	Indirekte Nachweisverfahren einer erfolgreichen Transfektion	75
D.1.3.2.1	Nachweisverfahren durch Antikörpermarkierung	76
D.1.3.2.2	Nachweisverfahren durch Aktivitätsnachweis (Enzym).....	77
D.1.4	Geeignete Regionen für Plasmidtransfektionen	78
D.1.4.1	Kortexbereiche des Großhirns.....	78
D.1.4.2	Hippocampusformation.....	80

D.1.4.3	Thalamus, Hypothalamus, lateraler Septumkern und Striatum	81
D.1.4.4	Transfektion neuronaler Zellen mit ihren Projektionen	84
D.1.5	Transfektion kortikaler Bereiche des dorsolateralen Großhirns	85
D.1.5.1	Quantitatives Auswerteverfahren mit Histogrammberechnungen	86
D.1.5.2	Quantitatives Auswerteverfahren durch Zellkörperauszählungen	90
D.2	Einfluss von PRG-1 auf die neuronale Migration.....	92
D.2.1	Einfluss einer PRG-1 Überexpression im kortikalen PRG-1-wt-Großhirn	93
D.2.2	Einfluss einer PRG-1 Überexpression im kortikalen PRG-1-ko-Großhirn	94
D.2.3	Einfluss eines PRG-1 „knock out“ im kortikalen PRG-1-cko Großhirn	95
D.3	Einfluss von LPP-1 und LPP-1a auf die neuronale Migration.....	97
D.3.1	Zelluläre Herunterregulation von LPP-1 und LPP-1a	97
D.3.2	Zelluläre Überexpression von LPP-1 im LPP-1-wt-Großhirn	99
D.3.3	Zelluläre Überexpression von LPP-1a im LPP-1a-wt-Großhirn.....	100
E	Diskussion	103
E.1	Etablierung der <i>In-utero-Elektroporationstechnik</i> mit C57BL/6-Mäusen.....	103
E.1.1	Etablierung und Optimierung der Elektroporation und Transfektion <i>in vivo</i>	103
E.1.2	Transfektion unterschiedlicher Plasmide	107
E.1.3	Geeignete Regionen des ZNS für Plasmidtransfektionen	110
E.1.4	Transfektion kortikaler Bereiche des dorso-lateralen Großhirns	112
E.2	Einfluss des Proteins PRG-1 auf die radiale Migration im Neokortex.....	114
E.3	Einfluss der Proteine LPP-1 und LPP-1a auf die radiale Migration im Neokortex....	117
F	Zusammenfassung	121
G	Summary	123
H	Zitierte Literatur	125
	Anhang.....	149
	Publikationsverzeichnis.....	155
	Danksagung	157
	Selbständigkeitserklärung	158

Abkürzungsverzeichnis

3.V	3. Ventrikel
Acc1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 1
AM	Amygdala
AS	Abschnitt
Ball	<i>Brevibacterium albidum</i> 1
BamHI	<i>Bacillus amyloiquefaciens</i> Hydrolyse 1
BglII	<i>Bacillus globigii</i> 2
bp	Basenpaare
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin
C-1-P	Ceramid-1-Phosphat
CA	<i>Cornu ammonis</i>
CD-1	„caesarean derivation 1“
CFP	„cyano fluorescent protein“/blau fluoreszierendes Protein
CMV	Cytomegalievirus
Cre	„cyclization recombinase“/Zyklisierungsrekombinase
cko	„conditional knock out“/konditionaler „knock out“
Clal	<i>Caryophanom latum</i> 1
CSS	„candidate sphingomyelin synthase“
Cy	„cytochrome“/Zytochrom
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA/DNS	„deoxyribonucleic acid“/Desoxyribonukleinsäure
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle Medium“/Dulbeccos modifi- ziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP	doppelt positiv
DsRed2	2. Variante des rot fluoreszierenden Proteins („Red“) aus <i>Discosoma</i> sp.
DYT	„double-strength yeast extract/tryptone“/doppelt konzen- triertes Hefeextrakt/Trypton
E	Embryonalstadium
<i>E. coli</i> TOP10/ <i>E. coli</i> XL10	Substämme von <i>Escherichia coli</i>
EcoRI	<i>Escherichia coli</i> Restriktionsenzym 1
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	„fetal calf serum“

Fw	„forward“/vorwärts
G-Protein	guaninnucleotid-bindendes Protein
G-6-P	Glukose-6-Phosphatase
GABA	„gamma-aminobutyric acid“/γ-Aminobuttersäure
GB	Gehirnbalken (<i>Corpus callosum</i>)
GFAP	„glial fibrillary acidic protein“/saures Gliafaserprotein
(E)GFP	„(enhanced) green fluorescent protein“/(verstärktes) grün fluoreszierendes Protein
GH	Großhirn (<i>Telencephalon</i>)
GD	<i>Gyrus dentatus</i>
HEK	„human embryonic kidney“/humane embryonale Niere
HindIII	<i>Haemophilus influenzae d 3</i>
HIP	Hippocampus
HY	Hypothalamus
ICR	„imprinting control region“/(Prägung)-Kontrollregion
IgG(1)	Immunglobulin (Antikörper) der Klasse G (1)
i.p.	<i>intraperitoneal</i>
IUE	<i>In-utero</i> -Elektroporation
IZ	Intermediärzone
KH	Kleinhirn (<i>Cerebellum</i>)
KP	kortikale Platte
Kpnl	<i>Klebsiella pneumoniae 1</i>
ko	„knock out“
LB	Luria Bertani
li/re	linke/rechte
LMS	lateraler migratorischer Strom
LP	Lipid-Phosphat
LPA(-1-R/-2-R)	„lysophosphatidic acid (-1/-2 receptor“/Lysophosphatsäu- re (-rezeptor 1/2)
LPP (LPP-1 und LPP-1a)	Lipid-Phosphat-Phosphatasen (1 und 1a)
LPT	Lipid-Phosphatasen/Phosphotransferasen
LS	lateraler Septumkern
LTR	„long terminal repeat“/ lange DNS-Wiederholungseinheit
LV	lateraler Ventrikel
MCS	„multiple cloning site“/mehrfache Klonierungsstelle
MH	Mittelhirn (<i>Mesencephalon</i>)
MK	motorischer Kortex
MZ	Marginalzone

NCBI.....	„National Center for Biotechnology Information“/National- es Informationszentrum für Biotechnologie
NcoI.....	<i>Nocardia corallina 1</i>
neo.....	Neomycin
NGS.....	„normal goat serum“/normales Ziegen Serum
NhaI.....	<i>Nitrobacter hamburgensis 1</i>
NotI.....	<i>Nocardia otitidis-cavarium 1</i>
OP.....	Operation
ori.....	„origin“/Ursprung
p.....	„probability value“/Signifikanzwert
P.....	postnatales Stadium
PB.....	„phosphate buffer“/Phosphatpuffer
PBS.....	„phosphate buffered saline“/Phosphat-gepufferte Koch- salzlösung
p.c..	<i>post conceptionem</i>
p.p.	<i>post partum</i>
<i>pCAG, pCAGGS, pCAGIG,</i>	
<i>pCGLH, pCLEG</i>	Plasmidvariationen mit „chicken-β-actin promotor“
PCR.....	„polymerase chain reaction“/Polymerase-Kettenreaktion
PFA.....	Paraformaldehyd
PK.....	piriformer Kortex
PKG.....	zyklische Guanosinmonophosphat abhängige Protein- kinase
poly A/pA.....	„poly adenylation“/Polyadenylatsequenzen
PRG (-1).....	„plasticity related gene (1)“/plastizität-assoziertes Gen (1)
PstI.....	<i>Providencia stuartii 1</i>
R.....	Resistenz
Rev.....	„reverse“/umgekehrt
RH.....	Riechhirn (<i>Bulbus olfactorius</i>)
RM.....	Rückenmark (<i>Medulla spinalis</i>)
RMS.....	rostral-migratorischer Strom
RNS/RNA.....	Ribonukleinsäure/„ribonucleic acid“
RSK.....	retrosplenialer Kortex
S-1-P.....	Sphingosin-1-Phosphat
SacII (= Kspl).....	<i>Kluyvera species 1</i>
Sall.....	<i>Streptomyces albus 1</i>
s.c.....	<i>subcutan</i>

SD	„standard deviation“/Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SE	Schnittebene
shRNA/shRNS	„short hairpin ribonucleic acid“/kurze haarnadelförmige Ribonukleinsäure
SMS	Sphingomyelin Synthase
sp.	<i>species</i>
Spel	<i>Sphaerotilus species 1</i>
SPP	Sphingosin-Phosphat-Phosphatase
SSK	somatosensorischer Kortex
STR	Striatum (<i>Corpus striatum</i>)
SV40	Simian-Virus 40
SVZ	subventrikuläre Zone
s/w	schwarz/weiß
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TH	Thalamus
UP	untere Platte
VHK	ventrale hippocampale Kommissur
VK	vordere Kommissur (<i>Commissura anterior</i>)
VZ	ventrikuläre Zone
Wnt	„wingless Int-1“
wt	Wildtyp
Xbal	<i>Xanthomonas badrii 1</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
Xhol	<i>Xanthomonas holcicola 1</i>
YFP	„yellow fluorescent protein“/gelb fluoreszierendes Protein
ZEBET	Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch
ZH	Zwischenhirn (<i>Diencephalon</i>)
ZNS	Zentrales Nervensystem

A Einleitung und Ziele der Arbeit

Die Entwicklung des Zentralen Nervensystems (ZNS) ist bei allen Lebewesen charakterisiert durch komplexe Abläufe primärer und sekundärer Kaskaden, die von einfachen zellulären Steuerungen bis hin zur Entwicklung eines umfassenden Organs führen. Fortschritte in der Genetik und der Molekularbiologie der letzten 2 Jahrzehnte haben es ermöglicht, Moleküle zu analysieren, welche die Entwicklung des zentralen Nervensystems regeln. Genetische Veränderungen, wie sie beispielsweise bei manchen Erbkrankheiten auftreten, können zu Störungen in diesen komplexen Prozessen führen. Häufig auftretende klinische Syndrome sind hierbei neurologisch bedingte Störungen, die beispielsweise zu Epilepsie, zu Schizophrenie oder zu Spastik und zu Paralyse führen können (de Kloet et al. 2005; Ben-Ari 2006; La Spada 2006; Manzini et al. 2010). Für die Erforschung der Bedeutung spezifischer Gene auf die Ausprägung solcher Phänotypen werden genetisch veränderte Tiere eingesetzt, in welche einzelne Gene eingeschleust („knock in“) oder in welchen gezielt Gene inaktiviert wurden („knock out“). Nachteile hierbei sind z. B., dass der Gesamtorganismus die genetische Manipulation gegenreguliert (Bai et al. 2003). Außerdem sind Genveränderungen, die eine embryonale Letalität nach sich ziehen, kaum studierbar. Der hohe Tierverbrauch bei der Generierung der transgenen Tiere und die langwierigen Zucht- und Kreuzungsprozesse führen dazu, dass solche Modelle bei Untersuchungen von Entwicklungsstörungen und deren zugrunde liegenden Pathomechanismen immer weniger Anwendung finden.

Mit der *In-utero*-Elektroporation (IUE) können bestimmte Gewebeareale bzw. Zelltypen innerhalb zeitlicher Begrenzungen genetisch beeinflusst und die Auswirkungen dieser manipulativen Regulation gezielt studiert werden (u. a. Saito und Nakatsuji 2001; Tabata und Nakajima 2001). Außerdem können durch die gleichzeitige Manipulation mehrerer Gene im selben Tier die Beeinflussung und das Zusammenspiel dieser Gene untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Technik der IUE zunächst an C57BL/6-Wildtypmäusen etabliert werden. Diese Etablierung war nicht zuletzt deswegen notwendig, weil der hier eingesetzte C57BL/6-Inzuchtstamm phänotypische Unterschiede zu anderen Mauslinien zeigt (Chen et al. 2005; Saito 2006; Tabata und Nakajima 2008). Es sollte geklärt werden, welche Bedingungen erfüllt sein müssen, um eine erfolgreiche Transfektion neuronaler Vorläuferzellschichten der subventrikulären Zone und des Hippocampus durchzuführen. Hierbei wurden die Schwerpunkte auf eine optimale Transfektionsrate und einen möglichst geringen Schaden für das Tier gelegt. Weiterhin wurden u. a. Daten über die Effizienz und die Spezifität einzelner und mehrfacher Manipulationen gewonnen und die Einsetzbarkeit in neuronalen Migrationsstudien ausgetestet.

Im 2. Abschnitt der Arbeit wurde die etablierte Methode an konkreten Anwendungsbeispielen eingesetzt. Hierbei wurde die neuronale Migration unter dem Einfluss des plastizität-assoziierten Gen 1 („plasticity related gene 1“, PRG-1), der Lipid-Phosphat-Phosphatase 1 (LPP-1) und der Spleißvariante Lipid-Phosphat-Phosphatase 1a (LPP-1a) bei der Maus untersucht.

Der Einfluss von PRG-1 auf die Erregungsleitung im Hippocampus konnte mithilfe der *In-utero*-Elektroporation (Trimbuch et al. 2009) in vorangegangenen Arbeiten untersucht werden. Jedoch sind die Regulationsmechanismen des PRG-1-abhängigen Signalwegs noch weitgehend unbekannt und bedürfen fortführender Untersuchungen (Bräuer und Nitsch 2008; Trimbuch 2009). In der hier vorgelegten Arbeit sollte die Migration postmitotischer Neurone unter der Beeinflussung des zellulären PRG-1-Haushalts durch die IUE im somatosensorischen Kortex analysiert und mögliche Migrationseffekte untersucht werden.

Für ein 2. Anwendungsbeispiel des hier etablierten Modells wurde die Wirkung von LPP-1 und LPP-1a auf die Entwicklung der kortikalen Platte im Großhirn untersucht. Die bisherigen Ergebnisse von LPP-1 und LPP-1a (Brindley 2004; Sigal et al. 2005) in der neuronalen Zellentwicklung sollten in dieser Arbeit weitergehend untersucht werden. Die postmitotischen Neurone im Großhirn wurden mithilfe der IUE genetisch manipuliert und mögliche kortikale Migrationseffekte analysiert. Die vorliegende Arbeit stellt eine Weiterführung der Untersuchungen von LPP-1 und LPP-1a dar (Gutsch 2007; Velmans 2010; Battfeld 2012). Sie soll dazu beitragen, Zeitpunkte für histologische Studien der Entwicklung, Migration und Differenzierung von Neuronen unter Einfluss dieser Proteine zu erschließen.

B Literaturübersicht

Viele genetisch bedingte Erkrankungen des menschlichen Gehirns, wie z. B. die Epilepsie oder der Autismus, entstehen während der embryonalen Entwicklung (z. B. Huttunen 1997; de Kloet et al. 2005; Ben-Ari 2006; La Spada 2006; Johansson et al. 2007; Manzini et al. 2010). Um diese genetischen Störungen, die durch Fehlfunktionen von Genen oder Proteinen verursacht werden (z. B. Harrison und Weinberger 2005; Russell et al. 2006; O'Donovan et al. 2008; Bill und Geschwind 2009; Mochida 2009; O'Donovan et al. 2009), besser verstehen zu können, ist es von entscheidender Bedeutung, dass man den molekularen und zellulären Hintergrund kennt.

Die Erforschung der molekularen Homöostase, die mit einer genetischen Komplexität einhergeht, ist methodisch meist schwer zu realisieren. Dies zeigt sich z. B. dadurch, dass bei einer Erkrankung im Gehirn oft mehrere Zelltypen in unterschiedlichen Gehirnarealen zu unterschiedlichen Entwicklungszeiten betroffen sind (Taniguchi et al. 2012). Die Anwendung der *In-utero*-Elektroporation im Tiermodell ermöglicht durch Manipulationen des molekularen Zellhaushalts die Erforschung von pathologischen Einflüssen und klinisch relevanten Gegenregulationen (Shimogori und Ogawa 2008; Taniguchi et al. 2012).

B.1 Die Technik der *In-utero*-Elektroporation

Die *In-utero*-Elektroporation wurde im Jahr 2001 als eine neue *In-vivo*-Technik zur Transfektion von Gensequenzen in der Großhirnrinde durch 3 unabhängige Artikel in der Fachliteratur erstmalig veröffentlicht (Fukuchi-Shimogori und Grove 2001; Saito und Nakatsuji 2001; Tabata und Nakajima 2001). Diese ersten publizierten Daten zeigten die vielseitige Einsatzmöglichkeit der nicht infektiösen *In-vivo*-Gentransfektion bei Mäuseembryonen.

Die aus dem Zentralkanal durch das Wachstum des Gehirns entstehenden liquorgefüllten Hohlräume des Ventrikelsystems werden bei Transfektionen des zentralnervösen Systems als Zugang für die Plasmidinjektion genutzt (u. a. Saito und Nakatsuji 2001; Tabata und Nakajima 2001; Matsuda und Cepko 2007). In den Vorläuferzellen der ventrikulären und subventrikulären Zone werden durch die Transfektion der Plasmide akute genetische Veränderungen durch eine verstärkte Expression der zusätzlich eingebrachten DNS-Sequenzen eingeleitet. Durch diese gezielte Veränderung können räumlich und zeitlich definierte Zellpopulationen untersucht werden und die Zusammenhänge untergeordneter Schritte bei der Organogenese aufgeklärt werden (Taniguchi et al. 2012).

Das Prinzip dieser Transfektion besteht darin, dass sich durch eine angelegte Spannung Poren in der Lipid-Doppelmembran der Zielzellen ausbilden, die groß genug sind, um Plasmide bis 10 Kilobasenpaaren passieren lassen zu können (Bockmann et al. 2008). Die negativ geladene DNS der Plasmide wandert in Richtung des positiven Pols der Elektrode und kann so gerichtet in die Zelle geleitet werden (Elektroporation). Die Poren der Lipid-Doppelmembran schließen sich kurz nach der Elektroporation wieder, ohne dass die Zelle Schaden nimmt. Diese Methode der Transfektion von Plasmiden kann in verschiedenen Zelltypen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien angewendet werden.

Durch die Manipulation von Vorläuferzellen können die Expressionen der durch die Plasmide eingebrachten Gensequenzen in ihren postmitotischen Tochterzellen nachgewiesen werden (Tabata und Nakajima 2008). Je nach Transfektionsregion und Embryonalalter werden so in unterschiedlichen Bereichen des Gehirns Zellen transfiziert (Swartz et al. 2001). Dementsprechend konnten in weiterführenden Transfektionsversuchen diverse Bereiche des embryonalen Isokortex (Borrell et al. 2005; Shimogori 2006; Langevin et al. 2007; Okada et al. 2007; Rice et al. 2010), des Riechhirns (Imamura und Greer 2013), der Amygdala (Soma et al. 2009), des Hippocampus (Nakahira und Yuasa 2005; Navarro-Quiroga et al. 2007), des Rautenhirns (Holland et al. 2012) und der inneren Ohranlage (Wang et al. 2012) erfolgreich im Tiermodell transfiziert werden. Ebenfalls wurden auf Grundlage dieser Technik Zellanalysen in postnatalen Stadien durchgeführt (Boutin et al. 2008). Bis jetzt konnten auch Zellen der Retina (de Melo und Blackshaw 2011), des Herzens (Ayuni et al. 2010), der Lunge (Gazdhar et al. 2006), der skelettalen Muskeln (Roorda et al. 2005) und der Milz (Tupin et al. 2003) *in vivo* mittels Elektroporation transfiziert werden.

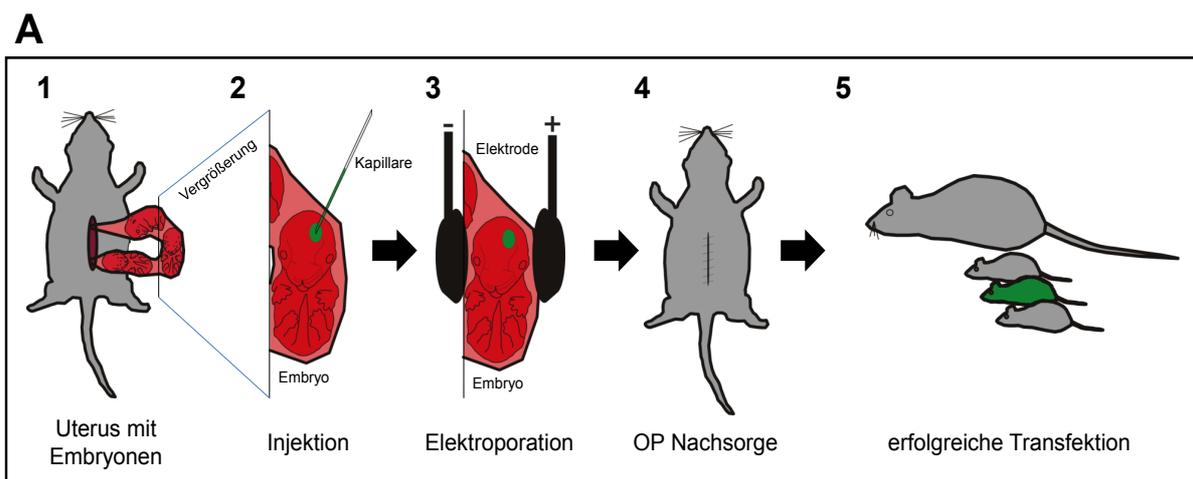
Die Transfektion von bestimmten Zielzellen wird nicht nur in Nagetieren angewendet. Diese Technik wurde erfolgreich bei Marderarten (Kawasaki et al. 2013), Amphibien (Echeverri und Tanaka 2003; Liu und Haas 2011), bei Fischen (Rambabu et al. 2005), bei Vögeln (Itasaki et al. 1999; Muramatsu 2000) und bei Polypen (Bosch et al. 2002) genutzt. In neueren Studien konnten spezifische Promotorsysteme oder induzierbare Systeme transfiziert werden (LoTurco et al. 2009; Yoshida et al. 2010; Nishiyama et al. 2012). Durch diese Art der Expression von transfizierten Genen in bestimmten Zelltypen und zu bestimmten Entwicklungszeiten, die eine herauf- oder herunterregulierende Wirkung auf Zellbestandteile haben, wurde eine breite Basis für vielfältigste Anwendungen in der Untersuchung der Zellentwicklung möglich.

Es wurde beschrieben, dass die zusätzlich eingebrachten Gensequenzen den Proteinhaushalt der transfizierten Zellen mehrere Wochen lang manipulieren konnten (Saito und Nakatsuji 2001). Die Auswirkung der Transfektion in den Zellen war bis ins adulte Alter bei Mäusen messbar (Taniguchi et al. 2012). Bisher ist aber noch nicht genau bekannt, wie lan-

ge eine Manipulation durch die *In-utero*-Elektroporation Einfluss auf die Struktur oder die Entwicklung der Zelle hat.

B.1.1 Validierung der Technik

Die ersten nichtinfektiösen Transfektionen von große DNS-Abschnitten, die vollständige Gene codierten, waren nur in Bakterienkulturen, Hefen, Säugetierzellen und Protoplasten von Pflanzen mittels Elektroporation möglich (Neumann et al. 1982; Paszkowski et al. 1984; Potter 1988). Im Jahr 1990 wurde erstmalig die *In-ovo*-Manipulation beschrieben (Pu und Young 1990). Bis um das Jahr 2000 galt sie als optimales Tiermodell für zelluläre Gentransfektionen im Gesamtorganismus (Swartz et al. 2001, Muramatsu et al. 1997). Die Elektroporation an aus dem Uterus entnommenen Mäuseembryonen wurde erstmalig 1999 durch die Transfektion des Rhombenzephalons gezeigt (Akamatsu et al. 1999). Nach solchen Transfektionen konnten die Embryonen nur wenige Stunden bis 3 Tage *ex utero* kultiviert werden (Inoue et al. 2001). Dazu wurden die Embryonen mit dem unbeschädigten ektoplazentalen Kegel in sauerstoff- und nährstoffangereicherten Medien in Rotationsschüttlern kultiviert (Piliszek et al. 2011). Zur Durchführung erfolgreicher *In-vivo*-Transfektionen von Mäuseembryonen wurde die Technik der *In-ovo*-Elektroporation (Itasaki et al. 1999; Momose et al. 1999) mit den Erkenntnissen aus der murinen *Ex-utero*-Transfektion kombiniert (Saito und Nakatsuji 2001; Tabata und Nakajima 2001). Der Ablauf einer Transfektion ähnelt sich dadurch bei beiden Systemen (Abbildung 1 A und B).



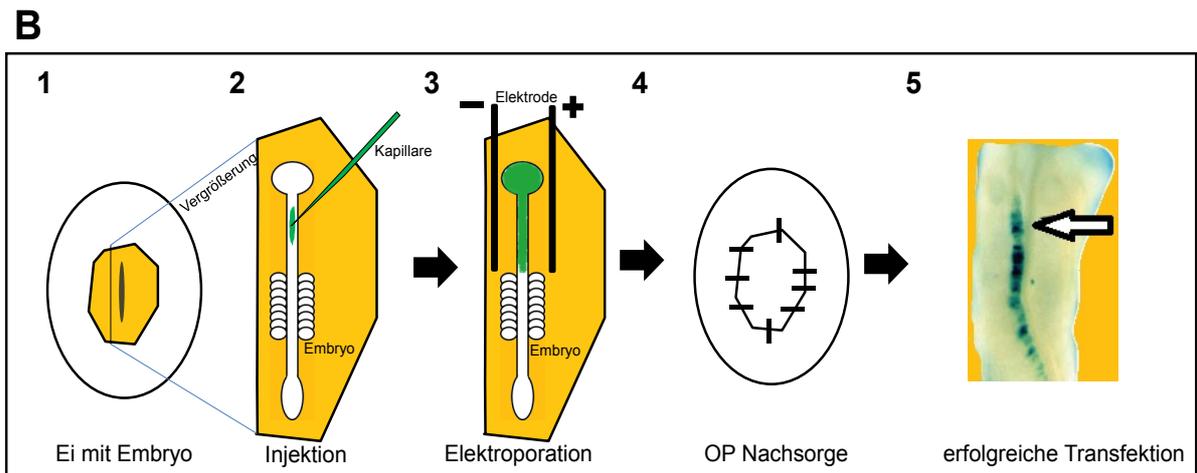


Abbildung 1: Schema der *In-utero*- und *In-ovo*-Elektroporationen

(A) Bei der *In-utero*-Elektroporation werden (1) die Uterushörner disloziert und (2) die Embryonen für eine Injektion von endotoxinfreier Plasmidlösung in einen der lateralen Ventrikel positioniert. (3) Durch die anschließende Elektroporation wird die negativ geladene DNS gerichtet transfiziert. (4) Der Uterus wird wieder *in situ* verbracht und die Wunde wird versorgt. Bei der (B) *In-ovo*-Elektroporation sind die Schritte der Transfektion ähnlich der *In-utero*-Elektroporation. (1) Das befruchtete Ei wird vorsichtig auf Höhe des Embryos von der Eischale befreit. (2) Anschließend wird die Plasmidlösung in das Neuralrohr injiziert und die (3) Elektroporation wird mit Stabelektroden durchgeführt. Nach dem Eingriff wird die Öffnung der Eischale (4) geschlossen und fixiert. Bei beiden Transfektionen (A5 und B5) lassen sich die manipulierten Embryonen anhand von Markersystemen identifizieren und analysieren (Itasaki et al. 1999; Kawauchi et al. 2003, modifiziert, Kopierrecht siehe Anhang 1A und 1B).

Durch die *In-utero*-Elektroporation ist es seit der letzten Jahrtausendwende möglich, gezielt Zellen des Gehirns in verschiedenen Entwicklungsstadien zu manipulieren und somit tiefere Einblicke in die Gehirnentwicklung und auch in pathologische Prozesse bei Gendefekten zu bekommen.

B.2 Die Entstehung des Gehirns

Der Anfang einer erkennbaren Gehirnanlage bei der Maus beginnt mit dem 8. Somitenstadium der Embryogenese. Zu dieser Zeit entwickelt sich am kranialen Pol des Embryos das Gehirn, während sich kaudal davon das Rückenmark ausbildet (Sakai 1987). 8 Tage *post conceptionem* (E8, *p.c.*) bildet sich aus der Großhirnanlage das „Dreibläschenstadium“, das sich in ein Vorderhirn (*Prosenzephalon*), ein Mittelhirn (*Mesenzephalon*) und ein Rautenhirn (*Rhombenzephalon*) unterteilen lässt. Das Neuralrohr besteht anfänglich aus einem mehrreihigen hochprismatischen Neuraepithel, deren apikale Zellspitzen als innere Grenzmembran (*Membrana limitans interna*) das spätere Ventrikelsystem begrenzen. Aus dem *Prosenzephalon* entwickeln sich Endhirn (*Telenzephalon*) und Zwischenhirn (*Dienzephalon*). Die beiden Hemisphären des *Telenzephalons* nehmen während der Embryogenese deutlich an Größe zu und bedecken das Zwischen-, Mittel- und Rautenhirn. Bei höheren Vertebraten

wird das Wachstum des Gehirns durch die knöchernen Schädelstrukturen eingeschränkt. Aus diesem Grund kommt es zur Oberflächenvergrößerung durch die Bildung von Furchen (*Sulci*) und Windungen (*Gyri*) (Ribas 2010; Sawada und Watanabe 2012). Dieses Wachstumsphänomen der Oberflächenvergrößerung bleibt jedoch bei einigen Kleinsäugetern (Nagetieren) und Vögeln aus (lissenzephales Gehirn, Gambello et al. 1999).

Die Großhirnrinde (*Cortex cerebri*) des Telenzephalons, auch als graue Substanz (*Substantia grisea*) bezeichnet, kann aufgrund ihres histologischen Aufbaus in einen sechsschichtigen Isokortex und einen drei- bis fünfschichtigen Allokokortex unterteilt werden (Trepel 2008).

B.2.1 Der Isokortex

Bei der Entwicklung der 6 Schichten des Isokortex sind Proliferation, Migration, Differenzierung, Apoptose und Myelinisierung die wichtigsten zellulären Vorgänge (Pearlman und Sheppard 1996; Walsh und Goffinet 2000; Götz und Huttner 2005; Ayala et al. 2007).

Die präsumtive Endhirnrinde besteht am Anfang der Entwicklung des Isokortex aus einer zellkörperhaltigen Ventrikulärzone (multipotente Stammzellen) mit einer anschließenden, zellkörperfreien Marginalzone (Bayer und Altman 1991). Aus den multipotenten Stammzellen bilden sich Glioblasten, die sich zur Radialglia entwickeln. Die Radialgliazellen verbinden die Marginalzone mit der Ventrikulärzone (Gadisseux et al. 1990). Es ist bekannt, dass radiale Gliazellen ebenfalls die Aktivität von Stammzellen beeinflussen (Alvarez-Buylla et al. 2001; Malatesta et al. 2003). In der anschließenden Entwicklung des Isokortex werden aus den multipotenten Stammzellen anfänglich neuronale Vorläuferzellen (Progenitorzellen) gebildet, die sich in der ventrikulären und in der subventrikulären Zone befinden (Caviness et al. 1995). Die ersten entstandenen Progenitorzellen wandern in Richtung Marginalzone aus und bilden die Intermediärzone. Dieses Phänomen lässt sich bei der Maus ab dem 11. Embryonaltag (E11, *p.c.*) beobachten (Gupta et al. 2002).

Die entstandene Marginalzone wird durch die verstärkte Einwanderung von Neuroblasten im 13.-14. Embryonalstadium (*p.c.*) der Maus gespalten. In diesem Bereich entstehen die untere Platte, die kortikale Platte und die oberflächliche Randzone. Die Bildung der einzelnen Schichten der kortikalen Platte wird durch auswandernde Neuroblasten aus den tiefen zu den oberflächlichen Schichten erwirkt („inside-out layering“, Angevine und Sidman 1961). Die oberflächliche Randzone (Schicht I = Marginalzone) besteht aus Cajal-Retzius-Zellen und zählt nicht, wie die anderen 5 Schichten (Schicht II = äußere Körnerschicht, Schicht III = äußere Pyramidenschicht, Schicht IV = innere Körnerschicht, Schicht V = innere Pyramidenschicht, Schicht VI = multiforme Schicht), zu der kortikalen Platte (Abbildung 2).

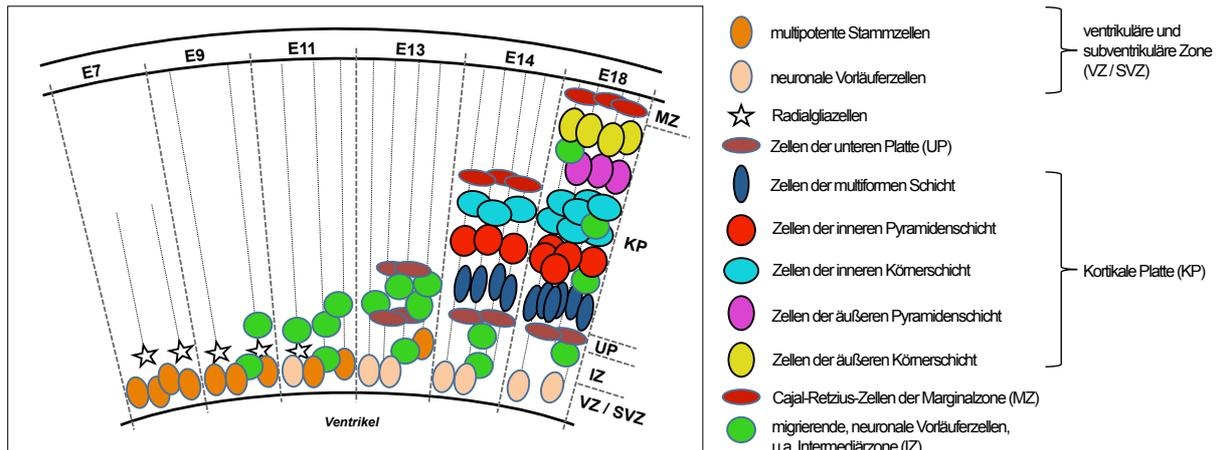


Abbildung 2: Entstehung des Isokortex bei der Maus während der Embryogenese

In einer Maus bilden die multipotenten Stammzellen in den frühen Stadien der Neurogenese Glioblasten, die sich zu Radialgliazellen differenzieren. Weiterhin entwickeln sich aus den Stammzellen neuronale Vorläuferzellen, die aus der Ventrikulär- und Subventrikulärzone (VZ/SVZ) in Richtung der äußeren Gehirnoberfläche wandern und die Intermediärzone bilden (IZ). Durch mitotische Zunahme der neuronalen Vorläuferzellen wird die ursprüngliche Marginalzone gespalten und es entstehen die untere Platte (UP), die kortikale Platte (KP) und die obere Randzone (Marginalzone, MZ). Durch „inside-out layering“ entstehen ab dem 14. Embryonaltag (E14, *p.c.*) die einzelnen Schichten der kortikalen Platte (E = Embryonalstadium, MZ = Marginalzone, KP = kortikale Platte, UP = Untere Platte, IZ = Intermediärzone, VZ = ventrikuläre Zone, SVZ = subventrikuläre Zone, Gupta et al. 2002, modifiziert, Kopierrecht siehe Anhang 1C).

B.2.2 Der Allokortex

Charakteristisch für den Allokortex ist der histologische Aufbau in 3-5 Zellschichten (D'Udine und Gozzo 1983). Er umfasst die Bereiche des Paläokortex, des Periallokortex und des Archikortex (Stephan 1976). Der Paläokortex ist für die Sinneswahrnehmung des Riechens und der Archikortex für die Verarbeitung von Emotionen und Erinnerung zuständig.

Der Archikortex umfasst das *Subiculum*, die Regionen des Ammonshorns (*Cornu ammonis*), die *Fascia dentata*, den *Hippocampus supracommissuralis* und den *Hippocampus praecommissuralis*. Die Regionen des Paläokortex sind der *Bulbus olfactorius*, der *Bulbus olfactorius accessorius*, das *Tuberculum olfactorium*, das *Septum* mit der *Regio periseptalis*, der *Regio praepiriformis*, der *Regio periamygdalaris*, der *Regio retrobulbaris* und der *Regio diagonalis*. Der Periallokortex stellt die Übergangsregionen des Paläo- und Archikortex dar und kann in Peripaläokortex und Periar-chikortex unterteilt werden. Zu ihnen zählen die anatomischen Strukturen des *Clastrum* (*Regio peripaläocorticalis claustralis*), der *Regio entorhinalis* mit der *Area perirhinalis*, die *Regio praesubicularis* mit der *Area parasubicularis*, die *Regio retrosplenialis* und die *Regio cingularis pericharchicorticalis* mit der *Area subgenualis* (Stephan 1975).

Der Archikortex, als ein Teil des limbischen Systems, ist mit dem paralimbischen Kortex und dem Isokortex räumlich und funktionell verbunden. Die Ammonshornregion 1 (CA-1) enthält kleine Pyramidenzellen und stellt sich in histologischen Präparaten durch ein kompaktes Aussehen dar (Frotscher et al. 1978; Harris und Stevens 1989). Die CA-2-Region ist ein Übergang zwischen CA-1 und CA-3, in ihr sind große Pyramidenzellen zu finden (Zhvaniia et al. 2005). Im adulten Gehirn existieren Projektionen aus den Schichten II (Stellatumneurone) und III (Pyramidenzellen) des entorhinalen Kortex über den *Tractus perforans* zum *Gyrus dentatus* und über den Alveus in die Regionen des Ammonshorns (Viktorov und Khaspekov 1976; Deng et al. 2006). Weiterhin projizieren kontralateral Mooszellen ihre Fasern zur inneren Molekularschicht des *Gyrus dentatus* und ins *Stratum radiatum* des Ammonshorns (CA-3, Zhvaniia et al. 2005). Fasern aus dem Septalen Kern des Großhirns enden ebenfalls im *Gyrus dentatus* und im Ammonshorn (DeFrance et al. 1972). Als Schaffer-Kollaterale bezeichnete Fasern verbinden die CA-3- mit der CA-1-Region innerhalb des Ammonshorns (Skutella und Nitsch 2001). Für die Bildung der einzelnen Strukturen sind diverse Signalmoleküle und deren Zusammenspiel im extra- und intrazellulären Raum ausschlaggebend. Z. B. wird die deutlich erkennbare Grenze zwischen der inneren und äußeren Molekularschicht des *Gyrus dentatus* auf die unterschiedliche Bindungsfähigkeit von Ephrinen zurückgeführt (Stein et al. 1999).

B.3 Die Entstehung des neuronalen Netzwerks

Aus den multipotenten Stammzellen des Neuralrohrs entwickeln sich spezifische Vorläuferzellen (Progenitorzellen, McKay 1997). Während der Teilungsphase der multipotenten Stammzellen und der Progenitorzellen im Neuralepithel kommt es zum Phänomen der Zellkernwanderung („interkinetic nuclear migration“, Sauer und Walker 1959; Seymour und Berry 1975). Dabei wandern in der mitotischen Teilungsphase die Zellkerne Richtung Innenlumen des Neuralrohrs (ventrikuläre Mitose). Mit beginnender DNS-Synthese (S-Phase) ziehen sich Zellkerne der entstandenen Tochterzellen in Richtung äußere Basalmembran (*Membrana limitans externa*) zurück (Del Bene et al. 2008).

Der anfänglich geringere Anteil an gebildeten Neuroblasten gleicht sich im 14.-15. Embryonalstadium (E14 und E15, *p.c.*) bei der Maus an und übersteigt bis zur perinatalen Phase den prozentualen Anteil der Progenitorzellen (Takahashi et al. 1996). Der Anteil an multipotenten Stammzellen sinkt postnatal auf weniger als 1 Prozent gegenüber der anfänglich vorhandenen Zellanzahl (Temple 2001; Wernig und Brustle 2002). Nur in definierten Regionen des ZNS, wie im Hippocampus (subgranuläre Zone des *Gyrus dentatus*), in der lateralen Ventrikelwand (ventrikuläre und subventrikuläre Zone) und im Riechkolben (*Bulbus olfactorius*)

existieren bei adulten Lebewesen diese multipotenten Zellen weiterhin (Carpenter et al. 1999; Nunes et al. 2003). In adulten Säugern wird ergänzend die Neurogenese durch Reize aus der Umwelt oder durch Verletzungen beeinflusst (Gould et al. 1997; Kempermann 2002). Beispielsweise führten eine zerebrale Ischämie sowie Läsionen im Nervengewebe zu einer Erhöhung der Neurogeneserate (Lopez-Garcia et al. 1992; Jiang et al. 2001; Sirko et al. 2009).

B.3.1 Zelluläre Migration im zentralen Nervensystem

Bei einer fehlenden oder gestörten Migration von neuronalen Zellen kann es zu schweren neurologischen Störungen beim Menschen kommen (Choi und Kudo 1981; Laure-Kamionowska und Maslinska 2011). Fehlt z. B. das extrazelluläre Glykoprotein Reelin während der Embryogenese, führt dies zu einem Defekt in der Schichtenbildung der kortikalen Platte und es entstehen klinische Symptome der Ataxie (Rugarli und Ballabio 1995; Curran und D’Arcangelo 1998).

Die neuronale Migration wird über komplexe Mechanismen auf zellulärer Ebene gesteuert. Durch chemotaktische und elektrische Signale aus der extrazellulären Matrix wird die Wanderung der Zellen in Form von Anziehung und Abstoßung gesteuert (Park et al. 2002; Jeong et al. 2009). Im Zuge dieses Prozesses wird die Architektur der Zellen entscheidend beeinflusst. Durch die Aktivierung von Proteinkinasen wird das Zytoskelett umgebaut und damit auch die Dynamik der Zelle verändert (Nadarajah und Parnavelas 2002). Die Zellen bilden während der Wanderung in Migrationsrichtung einen Wachstumskegel an ihren Zellausläufern aus (Marin und Rubenstein 2001).

In den bekannten 3 Migrationsarten (radiale Migration, tangentielle Migration und Kettenmigration) durchlaufen die neuronalen Zellen 3 Schritte bei der Zellwanderung. Nach dem Vorstrecken der Zellausläufer (Luo 2002) erfolgt die Translokation des Zellkerns (Nukleokinesis, Wynshaw-Boris und Gambello 2001). Mit dem Nachziehen der apikalen Zellanteile in Wanderungsrichtung schließt ein Zellwanderungszyklus ab (Horwitz und Parsons 1999).

Die radiale Migration bezeichnet die gerichtete Wanderung neuronaler Vorläuferzellen an glialen Strukturen, die zwischen der Marginalzone und der Vorläuferzellschicht des zerebralen Kortex ausgebildet sind (Gierdalski und Juliano 2002; Weissman et al. 2003). Die radiale Migration ist durch 3 unterschiedliche Formen der Zellbewegung, die somale Translokation, die Fortbewegung der Zelle (Lokomotion) (Nadarajah et al. 2001) und die multipolare Migration charakterisiert (Tabata und Nakajima 2003). Die somale Translokation findet in der ersten Phase der radialen Migration statt. Migrierende Zellen der ventrikulären Zone stehen mit

ihren Zellausläufern in Kontakt zur oberflächlichen Zone. Somit sind ihre Wanderwege schon vorgegeben, bevor das Zellsoma aus der ventrikulären Zone austritt. Die Phase der Lokomotion von neuronalen Zellen tritt in der späteren radialen Migration auf. Hier orientieren sich die Zellen an den glialen Strukturen und durchwandern das bereits gebildete komplexe Netzwerk der unteren Schichten der kortikalen Platte. In der multipolaren Migration exprimieren neu gebildete Zellen aus der Ventrikulärzone neuronale Marker und bilden viele ungerichtete Zellausläufer aus. Diese Zellen wandern an und zwischen den radialen Netzwerkstrukturen, bis sie am Bestimmungsort angekommen sind und dort differenzieren.

Eine 2. mögliche Wanderungsart von jungen Neuronen ist die tangentielle Migration. Sie ist, neben der beschriebenen radialen Migration, dadurch gekennzeichnet, dass unausgereifte Zellen parallel zur Oberfläche in den Kortex einwandern. Die späteren Interneurone wandern in saltatorischer Form durch Translokation ihrer Zellkerne vom ventralen in den dorsalen Teil des Telenzephalons. Man nimmt an, dass sie sich an Gradienten von Substanzen wie Slit1 (Yuan et al. 1999), Hepatozyten-Wachstumsfaktor (Powell et al. 2001) oder diversen Semaforinen (Marin et al. 2001) orientieren. GABAerge Neurone (GABA = Gamma-Aminobuttersäure) aus der mittleren ganglionischen Eminenz nutzen diese Art der Fortbewegung, um zu ihren Zielorten im Neokortex zu gelangen (O'Rourke et al. 1995; Anderson et al. 1997).

Die dritte bekannte Migrationsmöglichkeit ist die Kettenmigration („chain migration“). Hierbei wandern junge Vorläuferzellen über den rostral-migratorischen Strom (RMS) von der subventrikulären Zone zum *Bulbus olfactorius* aus. Man unterteilt die Zellen dieser Migrationsart nach ihren spezifischen Markern (Ihrle und Alvarez-Buylla 2008). Typ-A Zellen (Doublecortin positiv), auch als Neuroblasten bezeichnet, wandern aneinandergereiht entlang des lateralen Ventrikels und finden sich im RMS zusammen. Dabei werden sie von astrozyten-ähnlichen Zellen, den Typ-B Zellen (GFAP positiv, Nestin positiv), ummantelt. Typ-C Zellen (Olig positiv, Mash1 positiv) sind eine Zwischenstufe von Vorläuferzellen, die zwischen Typ-A und Typ-B Zellen in ihrer Differenzierung stehen. Sie haben eine hohe Teilungsrate und durchbrechen die Typ-B Zellverbände (Doetsch et al. 1997; Doetsch et al. 1999; Alvarez-Buylla et al. 2001). Am Zielort differenzieren sich diese Zellen zu GABAergen und dopaminergen Interneuronen der Granulär- und Periglomerulärschicht (Luskin 1993). Die Besonderheit bei dieser Form der Migration ist die klare Umgrenzung des RMS durch gliale Vorläuferzellen, welche wie ein Rohrsystem wirken. Dadurch wird kein neuronales (tangentielle Migration) oder gliales (radiale Migration) Gerüst benötigt (Doetsch und Alvarez-Buylla 1996). Die hier beeinflussenden Faktoren sind die polysialierte Form des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls, Slit, Netrin-1, Integrine und Reelin (Wu et al. 1999; Hu 2000; Hack et al. 2002; Murase und Horwitz 2002).

B.3.2 Differenzierung und Verschaltung im zentralen Nervensystem

Am Bestimmungsort angekommen, beginnen die Proneurone mit der Ausbildung des rauen endoplasmatischen Retikulums, der Golgi-Apparat nimmt an Größe zu und die Mitochondrien und Mikrotubuli vermehren sich (Farah et al. 2005).

Während der Differenzierung zeigt das Proneuron, als postmitotische Zelle, bei der Axon- ausbildung einen Wachstumskegel, der an der Spitze mit Filopodien ausgestattet ist und Zellorganellen enthält (Devoto 1990). Die Anordnung und die Anzahl der gebildeten Dendriten orientieren sich an der Anwesenheit synaptischer Ausbildungen zu den Nachbarzellen (van Pelt et al. 1997). Die aus einem Filopodium eines existenten Dendritenschafts hervorgehende Ausbildung ausgereifter Dendriten ist in Gewebekulturen untersucht worden (Dailey und Smith 1996). Anfänglich werden deutlich mehr Dendriten ausgebildet, als später die vollständig ausdifferenzierte Nervenzelle besitzt. Die typischen Verzweigungen entstehen durch Retraction und stimuliertes Wachstum (Cline 2001). Bei Kontakt der Filopodien mit der Zielzelle bilden sich kleine aktinreiche Ausstülpungen, dendritische Dornen, der späteren Postsynapse aus (Kaeck et al. 1997). Es kommt zur Vesikelansammlung an der aktiven Zone der Präsynapse und es bildet sich der synaptische Spalt aus (Scannevin und Hugarir 2000). An der Postsynapse bildet sich durch eine Verdichtung von Rezeptoren und Ionenkanälen die postsynaptische Dichte aus. Über Neurotransmitter werden Signalwege zwischen Prä- und Postsynapse ausgelöst, die in ihren Antworten der Expression der Rezeptoren und Ionenkanäle der Postsynapse entsprechen. Sperry definierte 1959 schon die „Chemoaffinitätshypothese“ (Sperry 1959), die die Ausbildung chemotaktischer Substanzen der Nervenzelle und der komplementären Stoffe der Zielzelle als Ausbildungsursache darstellt. Entsteht keine Verbindung zwischen den Zellen, kommt es zum Untergang der betreffenden Neurone.

B.4 Die Molekularbiologie der Lipid-Phosphatasen/Phosphotransferasen (LPT)

Zur Familie der LPT gehören die LPPs (Sciorra und Morris 2002), die SPPs (Mandala et al. 2000), die CSSs (Huitema et al. 2004), die SMSs (Huitema et al. 2004), die G-6-Ps (Pan et al. 1998) und die PRGs (Bräuer und Nitsch 2008). LPT kommen in den Zellmembranen der meisten Wirbeltierzellen vor und sind an vielfältigen essenziellen zellulären Prozessen wie beispielsweise der Signaltransduktion, dem intrazellulären Transport sowie dem Zellwachstum und -überleben beteiligt (Sigal et al. 2005). LPT sind in der Zellmembran mit 6 transmembranen Domänen verankert und besitzen sowohl einen extrazellulären als auch einen intrazellulären Anteil. In ihren 3 extrazellulären Schleifen befindet sich das katalytische Zent-

rum mittels derer sie Lipid-Phosphate (LP), Ceramid-1-Phosphate (C-1-P), Sphingosin-1-Phosphate (S-1-P) und Lysophosphatsäure (LPA) dephosphorylieren. Jedoch sind nicht alle LPT in der Lage, die oben erwähnten Substrate zu dephosphorylieren. Die PRGs und die CSSs haben aufgrund kritischer Änderungen in der konservierten Sequenz am katalytischen Zentrum ihre Phosphatasaktivität verloren (Sigal et al. 2005; Trimbuch et al. 2009). Es wird ihnen aber eine regulierende und interagierende Funktion in Signalübertragungen zugesprochen (Sigal et al. 2005). Intrazellulär steuern die Lipid-Phosphatasen/Phosphotransferasen den Lipidstoffwechsel und Signalkaskaden über die Amino- und Carboxytermini (Zhang et al. 2000).

B.4.1 Plastizität-assoziiertes Gen (PRG), eine nicht aktive Phosphatase

Die PRGs sind gehirnspezifische membranständige Proteine, welche durch die Arbeitsgruppe Nitsch (Institut für Mikroskopische Anatomie und Neurobiologie, Universitätsmedizin Mainz, Deutschland und Institut für Zell- und Neurobiologie, Charité Berlin, Deutschland) identifiziert und charakterisiert wurden (u. a. Bräuer et al. 2003; Trimbuch et al. 2009). Diese Klasse von Proteinen, besonders PRG-1 und PRG-3, werden verstärkt in der Regenerationsphase nach entorhinalen Kortextläsionen und während der Entwicklung der Embryonen und Jungtiere in Neuronen exprimiert. Aufgrund ihrer Einflüsse auf Filopodienbildung, Neuritenwachstum und Reorganisation nach Läsionen wurde den PRG eine wichtige Rolle in der Regulierung der zellulären Plastizität zugeschrieben (Bräuer et al. 2003; Peeva et al. 2006; Sigal et al. 2007; Trimbuch et al. 2009). Mittlerweile sind 5 Mitglieder der PRG-Familie durch *In-silico*-Analysen bekannt (PRG-1 bis PRG-5, Bräuer und Nitsch 2008). Sie sind in allen Wirbeltieren phylogenetisch hoch konserviert (Bräuer et al. 2003, Bräuer und Nitsch 2008).

B.4.1.1 Plastizität-assoziiertes Gen 1

PRG-1 ist das zuerst beschriebene Mitglied der PRG-Familie (Bräuer et al. 2003). Ein wichtiges Merkmal ist ein 400 Aminosäuren langer, hydrophiler C-terminaler Bereich im intrazellulären Raum des Proteins. Es wird vermutet, dass durch extrazelluläre Kopplung von Signalmolekülen an PRG-1 diverse Kontaktbereiche am C-Terminus durch Konformationsänderung frei werden und nach Bindungen von intrazellulären Molekülen oder Proteinen an diesen Stellen Signalkaskaden ausgelöst werden (Bräuer et al. 2003; Bräuer und Nitsch 2008; Trimbuch et al. 2009). Da durch den Aminosäureaustausch am katalytischen Zentrum der extrazellulären Domäne von PRG-1 keine Phosphataseaktivität mehr vorhanden ist (Stukey und Carman 1997; McDermott et al. 2004), geht man davon aus, dass PRG-1 durch andere Mechanismen mit Signalmolekülen interagiert (Bräuer und Nitsch 2008; Trimbuch et al.

2009). Vermutlich hat PRG-1 eine modulierende Wirkung auf den zellulären Lipid-Phosphat-Haushalt. Hierbei verhindert PRG durch eine erhöhte LPA-Bindung eine sonst induzierte Neuritenrückbildung (Bräuer et al. 2003; McDermott et al. 2004). Es zeigte sich weiterhin in Zellkulturversuchen, dass ein erhöhter Abbau von extrazellulären LPA nach Transfektion von Neuroblastomzellen (N1E-115) mit PRG-1 zu verzeichnen war. Außerdem konnte eine neuroprotektive Wirkung gegenüber einer erhöhten LPA-Konzentration gezeigt werden (Bräuer et al. 2003; McDermott et al. 2004).

Die Expression dieses Proteins beginnt mit dem Embryonalstadium 16 (E16, *p.c.*) und steigt postnatal bis zum juvenilen Alter in der Maus an (Kieselmann 2011). Lokalisiert ist PRG-1 ausschließlich in glutamatergen Neuronen (Trimbuch et al. 2009). Mithilfe von immunohistochemischen Untersuchungen fand man heraus, dass sich PRG-1 zellbiologisch an der postsynaptischen Dichte anlagert. Das Transkript von PRG-1 wurde in *Gyrus dentatus* (Körner- und Pyramidenzellen), Hippocampus (Ammonshorn) und entorhinalen Kortex mithilfe der *In-situ*-Hybridisierung gefunden (Trimbuch 2009).

Die Generierung einer PRG-1-defizienten Maus führte zu einem auffälligen Phänotyp der Tiere. In der juvenilen Phase der Entwicklung waren diese Jungtiere in ein starkes Entwicklungsdefizit geraten, das sich erst in der späten postnatalen Entwicklung der Maus kompensiert hatte (Trimbuch 2009). Diese PRG-1-defizienten Mäuse zeigen verstärkt konvulsive Anfälle, die einer Epilepsie ähneln. Elektrophysiologische Ableitungen der Prinzipalneurone im Hippocampus ergaben, dass die PRG-1-defizienten Zellen eine höhere spontane Vesikelfreisetzung haben, die sich in einem erhöhten exzitatorischen postsynaptischen Strom messen lässt (Trimbuch et al. 2009). Die genaue Ursache dafür wird im modulatorischen Zusammenspiel von PRG-1 mit Lysophosphatidsäure-2-Rezeptoren (LPA-2-R) und deren G-Proteingekoppelten Signalkaskaden vermutet. Dies bedarf aber noch weiterer Forschung und wurde zum heutigen Zeitpunkt noch nicht vollständig aufgeklärt (Trimbuch et al. 2009).

B.4.2 Lipid-Phosphat-Phosphatase (LPP), eine aktive Phosphatase

Die LPP gehören zur gleichen Familie wie PRG, besitzen jedoch Phosphataseaktivität. Durch ihre katalytischen Eigenschaften beeinflussen die LPP physiologische Prozesse wie Apoptose, Proliferation, Differenzierung und Migration von Zellen (Brindley 2004). In der neuronalen Entwicklung haben die Lipid-Phosphat-Phosphatasen einen positiven Einfluss auf das Neuritenwachstum und auch auf die Entwicklung und Regeneration von Neuronen (Fukushima et al. 2000; Smyth et al. 2003; Brindley 2004).

Bisher wurden 3 Isoformen der Lipid-Phosphat-Phosphatasen bestimmt, LPP-1 mit der Spleißvariante LPP-1a, LPP-2 und LPP-3 (Kai et al. 1997; Roberts et al. 1998). Die Proteine LPP-1, LPP-1a und LPP-3 wurden in vielen Geweben von Wirbeltieren detektiert (Sciorra und Morris 1999; Nanjundan und Possmayer 2001; Kai et al. 2006), u. a. im peripheren Nervensystem und im Gehirn (Sigal et al. 2005). Obwohl LPP-2 ubiquitär im Organismus vorkommt, ist es nur schwach im Gehirn exprimiert (Hooks et al. 1998). Auf der zellulären Ebene sind die LPPs in Zellmembranen lokalisiert (Jasinska et al. 1999; Ishikawa et al. 2000; Roberts und Morris 2000).

Die LPP-1- und LPP-2-defizienten Mäuse sind phänotypisch ohne besondere Befunde (Zhang et al. 2000; Tomsig et al. 2009), wohingegen das Fehlen von LPP-3 in einem Tier zur Letalität in der mittleren embryonalen Entwicklungsphase führt. Ursache hierfür ist vermutlich ein Defekt in der Bildung der Blutgefäße (Escalante-Alcalde et al. 2003). Außerdem treten bei bis zu 30 Prozent der LPP-3 defizienten Tiere Defekte in der Ausbildung der Anterior-Posterior-Achsensymmetrie auf. Dieser Phänotyp beruht auf der Aktivierung des Wnt-Signalweges („wingless Int-1“). Der Regulator des Wnt-Signalweges ist Axin, durch den die Genexpression verringert wird. Man nimmt an, dass LPA-3-Rezeptoren in der Kaskade der negativen Regulation des Wnt-Signalweges von Bedeutung sind (Escalante-Alcalde et al. 2003).

B.4.2.1 Lipid-Phosphat-Phosphatase 1 und Lipid-Phosphat-Phosphatase 1a

LPP-1 und die Spleißvariante LPP-1a, die zu 72 Prozent dieselbe Aminosäureabfolge haben, unterscheiden sich in der ersten extrazellulären Schleife zwischen dem 1. und 2. Transmembranprotein. Die katalytische Domäne beider Proteine ist gleich (Brindley und Waggoner 1998).

Ihre Expression in der Plasmamembran zeigt, dass LPP-1 und die Spleißvariante LPP-1a ektoenzymatische Eigenschaften besitzen und so durch Dephosphorylierung von Lipid-Phosphat (LP), Ceramid-1-Phosphat (C-1-P), Sphingosin-1-Phosphat (S-1-P) und Lyso-phosphatsäure (LPA) die Aktivierung von rezeptorspezifischen Signalkaskaden unterbinden können (Brindley und Pilquill 2009). So kann durch Dephosphorylierung an LPP-1 und LPP-1a gebildetes Monoacylglycerol (Mills und Moolenaar 2003) durch Bindung an spezifische Rezeptoren in Nervenzellen G-Protein gekoppelte Signalkaskaden aktivieren. Diese führen zur Neuritenrückbildung und Zellabrundung (Fukushima et al. 2000).

Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass eine Erhöhung des LPA-Levels im extrazellulären Raum das Auswachsen und die Migration von postmitotischen Neuronen fördert (Fukushima

et al. 2002). Das durch LPP-1 und LPP-1a ebenfalls beeinflussbare Sphingosin-1-Phosphat (S-1-P) kann durch spezifische Rezeptoraktivierung in Neuronen eine Neuritenrückbildung einleiten (McGiffert et al. 2002). Der Nachweis von LPP-1 und LPP-1a in intrazellulären Membranen lässt vermuten, dass sie zusätzlich in den intrazellulären Lipidstoffwechsel eingreifen können (Brindley und Pilquil 2009; Brindley et al. 2009).

Die phänotypische Unauffälligkeit des bisher einzigen LPP-1 defizienten Mausstamms (Zhang et al. 2000) resultiert vermutlich aus einer zum Wildtyp (Kontrolle) unveränderten Expression des Proteins im Gehirn (Tomsig et al. 2009). Somit kann dieser Stamm nicht für neurologische Untersuchungen herangezogen werden. LPP-1-überexprimierende Mäuse zeigen einige deutliche phänotypische Auffälligkeiten. Ihr Geburtsgewicht ist zu 50 Prozent reduziert, Abnormalitäten bei den Extremitäten kommen vermehrt vor und die Anzahl der Haarfollikel nimmt ab. Außerdem haben die Tiere Probleme in der Spermatogenese und gelten ab dem mittleren Alter als infertil (Yue et al. 2004). Dies macht deutlich, dass LPP-1 in vielen Prozessen einen wichtigen Einfluss hat.

C Tiere, Materialien und Methoden

C.1 Tiere

C.1.1 Gesetzlicher Rahmen

Alle Versuchstiere im Experiment sind unter Beachtung des Deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG, Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), zuletzt geändert durch Artikel 3 des Gesetzes vom 28. Juli 2014), der EU-Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Europäischen Rates (vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere) und der Verordnung zur Umsetzung unionsrechtlicher Vorschriften (EU-Richtlinie 2010/63/EU) zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere (Tierschutz-Versuchstierverordnung - TierSchVersV vom 1. August 2013 (BGBl. I S. 3125, 3126), zuletzt geändert durch Artikel 6 der Verordnung vom 12. Dezember 2013) behandelt worden. Weiterhin wurden die Bedingungen des Deutschen Gentechnikgesetzes (GenTG, 20.06.1990, zuletzt geändert durch Artikel 2 Absatz 27 und Artikel 4 Absatz 14 des Gesetzes vom 7. August 2013), der Gefahrstoffverordnung (GefStoffV, 26.11.2010, zuletzt geändert durch Artikel 2 der Verordnung vom 15. Juli 2013) und des Infektionsschutzgesetzes (IfSG, 20.07.2000, zuletzt geändert durch Artikel 2 Absatz 36 und Artikel 4 Absatz 21 des Gesetzes vom 7. August 2013) in den Versuchen beachtet.

Alle tierexperimentellen Eingriffe wurden vor Beginn der Arbeiten gemäß TierSchG und TierSchVersV durch Tierversuchsanträge und -anzeigen legalisiert:

1. Tierversuchsantrag nach § 8 TierSchG, Nummer G 0074/06 (Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin, Deutschland), Thema: „*In-utero* Applikation von Expressionsvektoren zur Untersuchung der Entwicklung und ihren Störungen des zentralen Nervensystems“ (Juli 2006 genehmigt, März 2010 Ummeldung durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz unter Tierversuchsantragsnummer G10-1-008, Koblenz, Deutschland)
2. Tierversuchsantrag nach § 8 TierSchG, Nummer G12-1-003 (Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz, Koblenz, Deutschland), Thema: „Transfektion von Expressionsvektoren *in vivo* zur Studie der neuronalen Entwicklung und deren Störungen im zentralen Nervensystem“ (Februar 2012 genehmigt)
3. Anzeige zur Tötung von Versuchstieren zu wissenschaftlichen Zwecken nach § 4 TierSchG, Nummer T0046/02 (Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin, Deutsch-

land), ohne jede Vorbehandlung mit anschließender Organentnahme (Januar 2002 genehmigt)

Weiterhin wurden folgende Datenbanken und Empfehlungen für das Arbeiten mit Versuchstieren genutzt:

1. Empfehlungen der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS, „Society of Laboratory Animals“, Philipps-Universität Marburg, Deutschland) und der europäischen Vereinigung wissenschaftlicher Versuchstierkundeverbände (FELASA, „Federation of Laboratory Animal Science Associations“, Ipswich, Großbritannien)
2. Datenbanksysteme „Current Contents Connect[®]“, MEDLINE („Medical Literature Analysis and Retrieval System Online“) und „Pubmed“, erreichbar über das Nationale Zentrum für Biotechnologieinformation (Bethesda, Maryland, USA), das Europäische Laboratorium für Molekularbiologie (Heidelberg, Deutschland) und das Portal Fachwissenschaftliches Protein-Analyse-System (Genf, Schweiz)
3. Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET, Bundesministeriums für Risikobewertung, Berlin, Deutschland)
4. Empfehlung des Arbeitskreises Berliner Tierschutzbeauftragter für die vorzeitige Tötung erheblich leidender Versuchstiere (2. Auflage vom 22. Juli 2009) und die Orientierungshilfe zur Einstufung in Belastungsgrade für genehmigungspflichtige Tierversuche (Stand 21.09.2010, Charité Berlin, Deutschland, www.charite.de/tierschutz/download)
5. Empfehlung: „Humane endpoints in animal experimentation for biomedical research: ethical, legal and practical aspects.“ (Morton 2000) von David B. Morton (Zentrum für Biomedizinische Ethik, Birmingham, Großbritannien)

C.1.2 Versuchstiere

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten adulten und embryonalen Mäuse

Ergebnisteil	Stamm	Anzahl tragende Mäuse (inklusive Kontrollen)	Anzahl transfizierte Embryonen (inklusive Kontrollen)	Anzahl nicht transfizierte Embryonen (= zusätzliche Kontrollen)
D.1.1	C57BL/6	227	460	1279
D.1.2.2	C57BL/6	1	3	0
D.1.2.3	C57BL/6	26	74	7
D.1.2.4	C57BL/6	11	44	0

Ergebnisteil	Stamm	Anzahl tragende Mäuse (inklusive Kontrollen)	Anzahl transfizierte Embryonen (inklusi- ve Kontrollen)	Anzahl nicht transfi- zierte Embryonen (= zusätzliche Kontrollen)
D.1.2.5	C57BL/6	14	48	8
D.1.2.6	C57BL/6	136	272	360
D.1.2.7	C57BL/6	48	96	0
D.1.2.8	C57BL/6	18	36	74
D.1.2.9.1	C57BL/6	31	56	14
D.1.2.9.2	C57BL/6	4	20	0
D.1.2.9.3	C57BL/6	1	5	0
D.1.2.9.3 (Bild)	C57BL/6	1	1	0
D.1.3.1	C57BL/6	1	1	0
D.1.3.2.1	ROSA-loxP	1	1	0
D.1.3.2.2	ROSA-loxP	1	1	0
D.1.4.1	C57BL/6	1	4	0
D.1.4.2	C57BL/6	1	4	0
D.1.4.3	C57BL/6	1	4	0
D.1.4.4	C57BL/6	1	4	0
D.1.5	C57BL/6	25	52	0
D.2.1	C57BL/6	4	14	0
D.2.2	PRG-1-ko	4	16	0
D.2.3	PRG-1-cko	4	13	0
D.3.1	C57BL/6	4	14	0
D.3.2	C57BL/6	8	23	0
D.3.3	C57BL/6	6	20	0
Anhang 4	C57BL/6	4	16	0

Folgende Versuchstiere wurden von kommerziellen Züchtern wie „The Jackson Laboratory“ (Bar Harbor, Maine, USA), „Janvier Labs“ (Saint Berthevin Cedex, Frankreich), „Harlan“ (Venray, Niederlande) und „Charles River“ (Sulzfeld, Deutschland) bezogen:

1. C57BL/6J- und C57BL/6N-Maus

Alias: Wildtyp, C57 Black, B6, B6J, Black 6
Fellfarbe: nicht agouti (schwarz)
Züchter: The Jackson Laboratory, Charles River und Janvier Labs

Ursprung:

Der C57BL/6J-Inzuchtstamm wurde 1921 von Dr. Little (Bussey-Institut für Forschung und angewandte Biologie, Harvard, USA) aus Nachkommen der Mauszuchten von Frau Abbie Lathrop (Massachusetts, USA) gezüchtet. 1974 wurden C57BL/6J-Mäuse von The Jackson Laboratory an Charles River übergeben und durch weiterführende Inzucht entstand der C57BL/6N-Stamm.

Zusätzliche Informationen:

Aufgrund von Rückkreuzungen (Hintergrundstamm) der nachfolgend aufgelisteten gentechnisch veränderten Mauslinien mit diesem Inzuchtstamm wurde der C57BL/6-Mausstamm als Kontrolle (Wildtypmaus) in dieser Arbeit bevorzugt verwendet. Weiterhin ist bekannt, dass der Mausstamm eine weite Verbreitung in der biomedizinischen Forschung hat (Zurita et al. 2011).

2. B6.129S4-Gt(ROSA)26Sor^{tm1Sor}/J-Maus

Alias: ROSA26-loxP
Fellfarbe: nicht agouti (schwarz)
Züchter: The Jackson Laboratory

Ursprung:

Dieser Inzuchtstamm wurde von The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) aus der B6;129S-Gtrosa26-Maus von Dr. Philippe Soriano (Fred-Hutchinson-Tumorzentrum, Seattle, USA) entwickelt. Diese Mutante wurde durch retrovirale Insertion des Beta-Galaktosidase-Gens in embryonalen Stammzellen erzeugt.

Zusätzliche Informationen:

Die transgene Mauslinie trägt ein zusätzliches DNS-Segment im Chromosom 6 („knock in“) (Friedrich und Soriano 1991). Das *lacZ*-Gen der Beta-Galaktosidase wird durch diese Sequenz codiert. Das Enzym Beta-Galactosidase spaltet Laktose in Galaktose und Glukose. Ein vorangeschaltetes Stoppkodon im zusätzlichen DNS-Segment, welches die Translation des *lacZ*-Gens unterdrücken soll, ist durch 2 *loxP*-Stellen begrenzt. Durch Zugabe einer Cre-Rekombinase kann an beiden *loxP*-Stellen über eine Schleifenbildung der Genabschnitt des

Stoppkodons entfernt werden. Die Bildung der Beta-Galaktosidase wäre damit nicht länger unterdrückt (Abbildung 3).

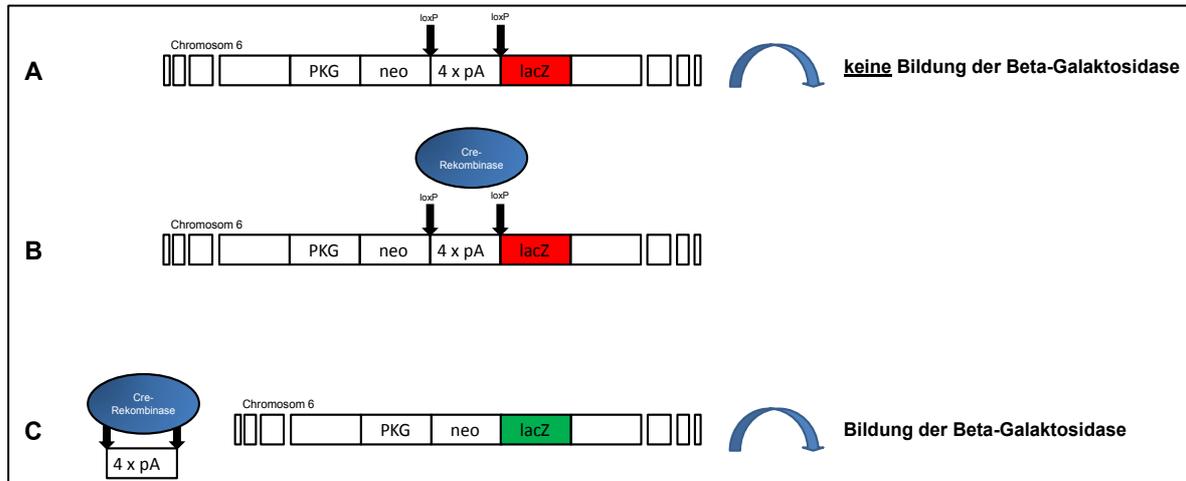


Abbildung 3: Schema des Cre/loxP-Systems der B6.129S4-Gt(ROSA)26Sor^{tm1Sor}J-Maus

(A) Der zusätzlich in Chromosom 6 eingefügte Genabschnitt enthält das *lacZ*-Gen, das die Beta-Galaktosidase codiert. Durch vorangeschaltete Polyadenylatsequenzen (4 x pA), die als Stoppkodon funktionieren, kommt es nicht zur Transkription des *lacZ*-Gens und damit zur Bildung der Beta-Galaktosidase. (B) Mit der Hinzufügung der Cre-Rekombinase zum System werden (C) die Polyadenylatsequenzen entfernt. Nach dieser Entfernung des Stoppkodons können die Transkription des *lacZ*-Gens und die nachfolgende Translation der Beta-Galaktosidase eingeleitet werden (PKG = zyklische Guanosinmonophosphat abhängige Proteinkinase, neo = Neomycin, 4 x pA = Polyadenylatsequenzen (Stoppkodon), *lacZ* = Gensequenz der Beta-Galaktosidase, *loxP* = spezifische Basensequenzen zur Erkennung und Einleitung des Rekombinationssystems mit der Cre-Rekombinase).

3. B6.Cg-Prg1e2H-10^{Mdcb}-Maus

Alias: PRG-1-ko

Fellfarbe: nicht agouti (schwarz)

Züchter: Zentrale Versuchstiereinrichtung der Universitätsmedizin Mainz

Ursprung:

Dieser Mausinzuchtstamm wurde von Dr. Trimbuch (Neurowissenschaftliches Forschungszentrum, Charité Berlin, Deutschland) in Zusammenarbeit mit Dr. Holtmann (Transgene Technologie, Universität Würzburg, Deutschland) im Jahr 2006 generiert. Die konstitutive „Knock out“-Linie wurde 2009 von Univ.-Prof. Dr. Dr. Nitsch (Institut für Mikroskopische Anatomie und Neurobiologie, Universitätsmedizin Mainz, Deutschland) nach Mainz überführt.

Zusätzliche Informationen:

In dem murinen plastizität-assoziierten Gen 1 (*mprg-1*, NCBI: AF541279, Chromosom 3) wurde durch homologe Rekombination in den Bereichen von Exon 4-6 eine IRES-*lacZ*-MC1neo-Kassette inseriert. Durch Stoppkodons, die mit der zusätzlichen Kassette ins Ge-

nom eingebracht wurden, kam es zum Abbruch der Transkription von *mprg-1* im Exon 4. Die Bildung des Proteins PRG-1 war damit unterbunden worden (Trimbuch 2009). In homozygoter Form des *mprg-1* im *In-vivo*-Modell („knock out“) zeigen die Mäuse in der juvenilen Phase (19-23 d, *post partum*) konvulsive Anfälle, die eine erhöhte Letalität dieser Tiere zur Folge hat (Trimbuch et al. 2009).

4. B6.Cg-*Prg1G12A8^{tm1Mdc6}*-Maus

Alias: PRG-1-cko

Fellfarbe: nicht agouti (schwarz)

Züchter: Zentrale Versuchstiereinrichtung der Universitätsmedizin Mainz

Ursprung:

Der konditionale PRG-1-„knock-out“-Inzuchtstamm wurde von Dr. Trimbuch (Neurowissenschaftliches Forschungszentrum, Charité Berlin, Deutschland) in Zusammenarbeit mit Dr. Jerchow (Transgene Core Facility, Max-Delbrück-Zentrum Buch, Berlin, Deutschland) im Jahr 2007 generiert. Diese Linie wurde 2009 an die Universitätsmedizin Mainz von Univ.-Prof. Dr. Dr. Nitsch (Institut für Mikroskopische Anatomie und Neurobiologie, Universitätsmedizin Mainz, Deutschland) überführt.

Zusätzliche Informationen:

Durch homologe Rekombination wurden *LoxP*-Stellen im Intron 3 und 6 des PRG-1-Gens (*mprg-1*) eingefügt. Durch Zugabe einer Cre-Rekombinase konnte durch Schleifenbildung die Gensequenz zwischen Exon 4 und 6 entfernt werden. Die Translation und Transkription des vollständigen PRG-1-Proteins wurde auf diese Art unterbunden (Trimbuch 2009).

C.2 Materialien

C.2.1 Geräte und Programme

Tabelle 2: Verwendete (A) Geräte und (B und C) Programme

A) Geräte	Hersteller
Binokulare:	
- Binokular GZ 6	Leica (Bensheim, Deutschland)
- Binokular KL 1500	Zeiss (Jena, Deutschland)

A) Geräte	Hersteller
- Binokular S8AP0	Leica (Bensheim, Deutschland)
Digitale Kamera Photometric Cool Snap ES	Visitron Systems (Puchheim, Deutschland)
Digitale Kamera Intas	Intas (Göttingen, Deutschland)
Elektrophoresesystem PerfectBlue™	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
Elektroporator CUY 21 EDIT + Elektroden CUY 650 P 0,5-10 mm	Nepagene (Ichikawa, Japan)
Elektroporator BTX BCM 830	Harvard Apparatus Inc. (Holliston, Massachusetts, USA)
Geldokumentationsanlage	Intas UV-Systeme (Göttingen, Deutschland)
Heizblock SK1101D	Duxford, (Cambridge, Großbritannien)
Inkubator Sanyo MCO-20AIC	Sanyo Electric Biomedical Co., Ltd. (Osaka, Japan)
Kapillarzyehrer P-97	Sutter Instruments Co. (Novato, Kalifornien, USA)
Kryostat Leica CM1900	Leica (Bensheim, Deutschland)
Mastercycler Gradient	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Microgrinder EG-44	Narishige (London, Großbritannien)
Mikroskope:	
- Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop TCS SL	Leica (Bensheim, Deutschland)
- Fluoreszenzmikroskop BX50	Olympus (Hamburg, Deutschland)
- Fluoreszenzmikroskop Ck2	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Netzgerät für Elektrophoreseanwendung EV202	Consort (Turnhout, Belgien)
Photometer:	
- Pharmacia Biotech Ultrospec 1000	Pharmacia Biotech (Cambridge, Großbritannien)
- Pharmacia Biotech Ultrospec 2000	Pharmacia Biotech (Cambridge, Großbritannien)
Thermoschüttler	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
UV-Lampe	Nightsea bluestar (Tektite, Trenton, USA)
Vibratom (HM 650 V)	MICROM International GmbH (Walldorf, Deutschland)
Vortex Genie™2	Bender & Hobein AG (Zürich, Schweiz)
Zentrifugen:	
- Biofuge	Heraeus (Hanau, Deutschland)
- Zentrifuge 5804R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
- Zentrifuge 5471R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

B) Computerprogramme	Hersteller
Adobe® Photoshop 1.) Bearbeitung der Abbildungen 1A, 1B, 2, 3A, 3B, 3C, 4A-4F, 7 (Grafik), 13A, 30A, 31A, 32A, 33A 2.) Beschriftung der Abbildungen 5A-5I, 6, 7, 8, 13B, 14 (Markierung), 25, 27 (Markierung Pfeil), 29 (Markierung Pfeil), 35	Adobe (München, Deutschland)
CorelDRAW® Graphics Suite 1.) Bearbeitung der Abbildungen 1A, 1B, 2, 3A, 3B, 3C, 4A-4F, 7 (Grafik), 13A, 30A, 31A, 32A, 33A 2.) Beschriftung der Abbildungen 5A-5I, 6, 7, 8, 13B, 14 (Markierung), 25, 27 (Markierung Pfeil), 29 (Markierung Pfeil), 35	Corel Corporation (Ottawa, Kanada)
C) Datenverarbeitungsprogramme	Hersteller
ImageJ	Nationale Gesundheitsinstitute (Bethesda, Maryland, USA)
Leica confocal software (LCS)	Leica (Bensheim, Deutschland)
MetaMorph® (Version 7.7.3)	Molecular Devices (Sunnyvale, Kalifornien, USA)
Microsoft Office® (Version 2010)	Microsoft Corporation (Redmond, Washington, USA)
SPSS (Version 17 und 18)	Zentrale Datenverarbeitungsstelle (Universitätsmedizin Mainz, Deutschland)
PRISM® (Version 5.04)	GraphPad Software Inc. (La Jolla, Kalifornien, USA)

C.2.2 Plasmide

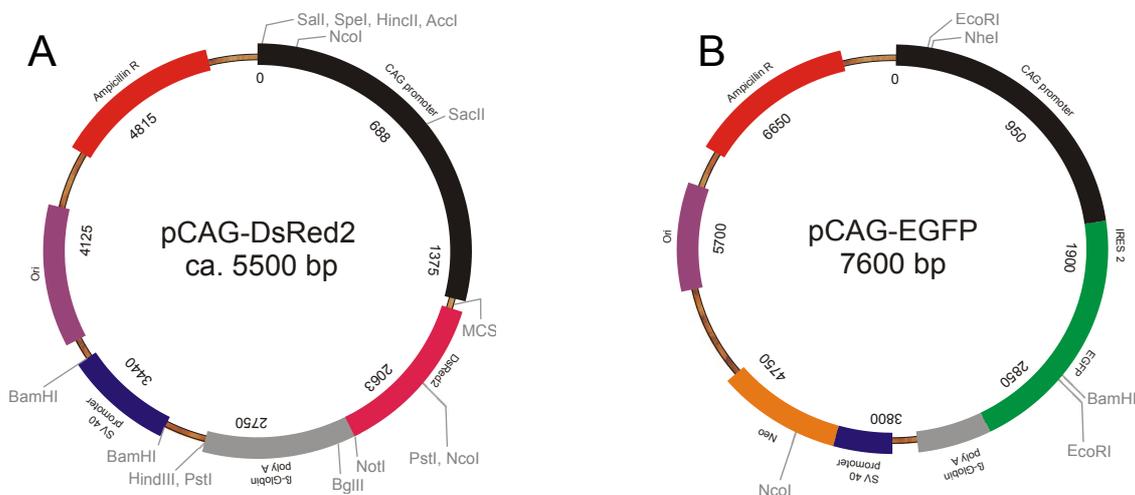
Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide für Zelltransfektionen *in vitro* und *in vivo* wurden durch kommerzielle Anbieter und Kooperationspartner zur Verfügung gestellt.

Die Plasmide *pCAG-DsRed2* und *pCAGIG* wurden von Addgene (Cambridge, Großbritannien) erworben. Das Plasmid *pCAG-EGFP*, bezogen von Prof. Dr. Parnavelas (College Universität London, Großbritannien), wurde zusätzlich mit den Gensequenzen für das Protein Lipid-Phosphat-Phosphatase 1 und der Spleißvariante Lipid-Phosphat-Phosphatase 1a (Dr. Berger, Institut für Mikroskopische Anatomie und Neurobiologie, Universitätsmedizin Mainz, Deutschland), dem PRG-1 und der Cre-Rekombinase (beide von Dr. Trimbuch, Neurowis-

senschaftliches Forschungszentrum, Charité Berlin, Deutschland) ausgestattet. Durch die Kooperation (Brandt et al. 2007) mit Mladen-Roko Rašin (Institut für Neurowissenschaften, Yale University, New Haven, USA) konnten die Plasmide *pCLEG*, *pCAGGS* und *pCGLH* für weiterführende Versuche zur Verfügung gestellt werden. Durch Einbringung der Gensequenz einer *shRNA*, die die Lipid-Phosphat-Phosphatase 1 und Lipid-Phosphat-Phosphatase 1a herunterregulieren soll, wurde das Plasmid *pCGLH* modifiziert (Dr. Velmans und Dr. Gutsch, ehemals AG Bräuer, Institut für Zell- und Neurobiologie, Charité Berlin, Deutschland).

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Plasmide

Bezeichnung Plasmid	Größe (Plasmid)	Zusätzlich eingebrachte Gensequenz (Insert) codiert	Größe (Insert)
<i>pCAG-DsRed2</i>	5,5 kb	nicht vorhanden	-
<i>pCAG-EGFP</i>	7,6 kb	nicht vorhanden	-
<i>pCAG-Cre</i>	8,6 kb	Cre-Rekombinase	1 kb
<i>pCAG-LPP1</i>	8,5 kb	Lipid-Phosphat-Phosphatase 1	0,88 kb
<i>pCAG-LPP1a</i>	8,5 kb	Lipid-Phosphat-Phosphatase 1a	0,88 kb
<i>pCAG-mPRG1(FLAG)</i>	ca. 9 kb	Plastizität-assoziiertes Gen 1	2,3 kb
<i>pCAGGS</i>	5,7 kb	nicht vorhanden	-
<i>pCAGIG</i>	6,14 kb	nicht vorhanden	-
<i>pCLEG</i>	7 kb	nicht vorhanden	-
<i>pCGLH</i>	7,9 kb	nicht vorhanden	-
<i>pCGLH-shRNA LPP1/-1a 230</i>	7,9 kb	shRNA für Lipid-Phosphat-Phosphatase 1 und -1a	0,065 kb



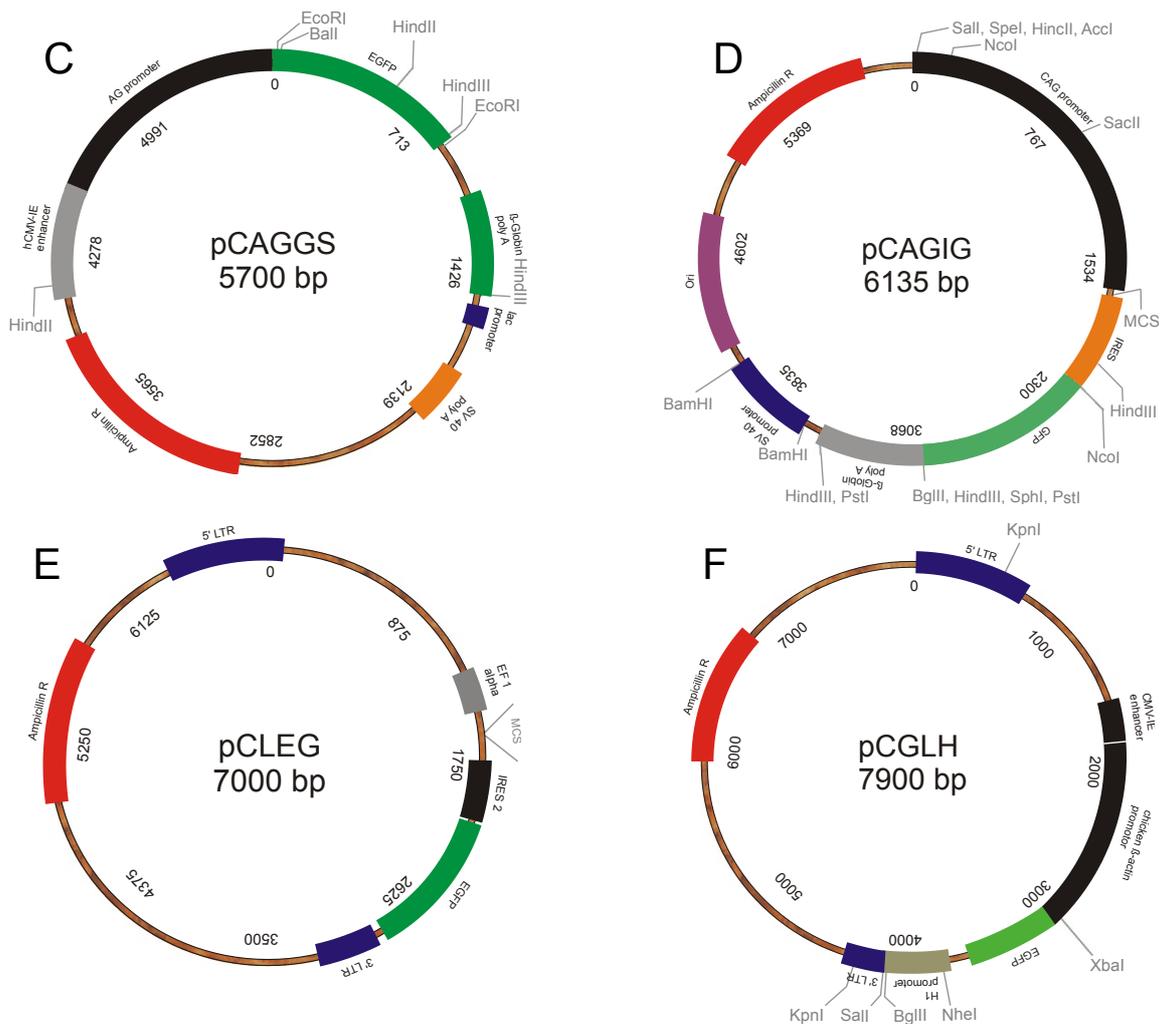


Abbildung 4: Vektorkarten der verwendeten Plasmide

Für die Transfektionen wurden folgende Plasmide mit und ohne Insert verwendet: (A) *pCAG-DsRed2*, (B) *pCAG-EGFP*, (C) *pCAGGS*, (D) *pCAGIG*, (E) *pCLEG* und (F) *pCGLH* (ori = „origin“, MCS = „multiple cloning sites“, bp = Basenpaare, CMV = Cytomegalievirus, SV40 = Simian-Virus 40, neo = Neomycin, CAG = „Chicken- β -actin-promoter“, LTR = „long terminal repeats“, R = Resistenz, poly A = „poly adenylation“, DsRed2 = 2. Variante des rot fluoreszierenden Proteins („Red“) aus *Discosoma sp.*, (E)GFP = („Enhanced“/verstärktes) grün fluoreszierendes Protein aus *Aequorea victoria*).

Für den Kontrollverdau in Kultur angezogener Plasmide wurden Restriktionsenzyme verwendet, die unterschiedlich große Teilstücke durch die anschließende Gelelektrophorese erkennen ließen (Tabelle 4). Es wurden in weiterführenden Transfektionen die Plasmide verwendet, die nach Restriktion von Teilproben die zu erwartenden Größen der Banden im Gel zeigten.

Tabelle 4: Restriktionsverdau der Plasmide mit den entsprechenden Enzymen und den zu erwartenden Größen der Banden

BamHI = *Bacillus amyloiquefaciens* Hydrolyse 1, BglII = *Bacillus globigii* 2, ClaI = *Caryophanom latum* 1, EcoRI = *Escherichia coli* Restriktionsenzym 1, HindIII = *Haemophilus influenzae* d 3, KpnI = *Klebsiella pneumoniae* 1, NotI = *Nocardia otitidis-cavarium* 1, Sall = *Streptomyces albus* 1, SpeI = *Sphaerotilus species* 1, XhoI = *Xanthomonas holcicola* 1

Vektor	Restriktionsenzyme	Größe der Banden
<i>pCAG-DsRed2</i>	SpeI, NotI	2,4 kb, 3,1 kb
<i>pCAG-EGFP</i>	EcoRI	2,6 kb, 5 kb
<i>pCAG-Cre</i>	HindIII, XhoI	1 kb, 7,6 kb
<i>pCAG-LPP1</i>	Sall, BglII	3 kb, 5,5 kb
<i>pCAG-LPP1a</i>	Sall, BglII	3 kb, 5,5 kb
<i>pCAG-PRG1(FLAG)</i>	ClaI, BamHI	2,2 kb, 7,6 kb
<i>pCAGGS</i>	Sall, HindIII	2,52 kb, 3 kb
Vektor	Restriktionsenzyme	Größe der Banden
<i>pCAGIG</i>	KpnI, Sall	2,2 kb, 3,95 kb
<i>pCLEG</i>	XhoI, NotI	1,3 kb, 5,7 kb
<i>pCGLH</i>	BglII, KpnI	0,3 kb, 7,6 kb
<i>pCGLH-shRNA LPP1/-1a 230</i>	BglII, KpnI	0,35 kb, 7,6 kb

C.2.3 Bakterien, Wachstumsmedien, Antibiotika

Für die erfolgreiche Klonierung und Expression von Plasmiden wurden Bakterienstämme von *Escherichia coli* (*E. coli*), *E. coli* TOP10 und *E. coli* XL10-Gold genutzt. Zur Anzucht dieser Bakterienstämme wurden folgende Medien (Tabelle 5) in Kombination mit dem Antibiotikum Ampicillin (Sigma-Aldrich®, Hamburg, Deutschland, 100 Milligramm je Milliliter in H₂O, in einer Endkonzentration von 100 Mikrogramm je ml Wachstumsmedium) verwendet.

Tabelle 5: Verwendete Anzuchtmedien zur Anreicherung von Bakterien

LB = Luria Bertani, DYT = „double-strength yeast extract/tryptone“

Medium	Herstellung
LB	10 g/l NaCl, 10 g/l Trypton/Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, pH 7
DYT	16 g/l Bacto-tryptone, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7
pH 7, autoklavieren, Antibiotikum Ampicillin dazugeben	

Medium	Herstellung
LB - Agar	10 g/l NaCl, 10 g/l Trypton/Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 15-20 g/l Agar-Agar
DYT - Agar	10 g NaCl/l, 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Agar
pH 7, autoklavieren, abkühlen lassen (40-50 Grad Celsius), Antibiotikum Ampicillin dazugeben	

Für die Zellkultur wurde dem Nährmedium DMEM (Gibco® Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) substituiert mit FCS (Gibco® Life Technologies, 10 Prozent) die Antibiotika Penicillin und Streptomycin (Sigma-Aldrich®, Hamburg, Deutschland, 1 Prozent umfassende Konzentration) hinzugefügt.

C.2.4 Weitere Puffer und Lösungen

Es wurden zur Vor- und Nachbereitung der durchgeführten Experimente folgende Puffer- und Lösungsansätze verwendet (Tabelle 6):

Tabelle 6: Weitere Puffer- und Lösungsansätze mit Zusammensetzung und Herstellung

DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, DMSO = Dimethylsulfoxid, DNS = Deoxyribonucleinsäure, EDTA = Ethylen-diamintetraacetat, EtBr = Ethidiumbromid, NGS = „normal goat serum“, PB = „phosphate buffer“, PBS = „phosphate buffered saline“, SDS = Sodiumdodecylsulfate, TBE = TRIS-Borat-EDTA-Puffer, X-Gal = 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

Puffer/Lösungen	Herstellung/Zusammensetzung
Agarose Gel Elektrophorese	
TBE-Puffer, 10 x	108 g/l Tris, 55 g/l Borsäure, 40 ml/l EDTA 0,5 M pH 8,0
TBE-Guanosin-Puffer, 10x	10-x-TBE-Puffer mit 2,83 g/l Guanosin
Ladepuffer, 10x	500 g/l Saccharose, 2,5 g/l Bromphenolblau (in 1-x-TBE-Puffer)
EtBr Färbelösung	5 mg/ml EtBr in H ₂ O
Isolierung genomischer DNS	
0,5 Prozent SDS-Extraktionspuffer	0,10 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 25 mM EDTA, 0,5 Prozent SDS
Proteinase K Lösung	10 mg/ml in H ₂ O
RNase-A-Lösung	5 mg/ml in H ₂ O

Puffer/Lösungen	Herstellung/Zusammensetzung
Immunhistochemische Puffer und Lösungen	
0,1 M Borat-Puffer	6,18 g/l Borsäure (pH 8,5)
DAPI-Lösung	2 mg/l DAPI in 1 l 0,1 M PB, Ultraschallbad, auf 0,2 µg/ml verdünnen
PBS-Puffer (0,1 M)	8,1 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 2,9 g/l Dinatriumhydrogenphosphat Heptahydrat (Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O), 0,24 g/l Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) in 1 l H ₂ O
4-prozentige PFA-Lösung	4 g/50 ml (H ₂ O) Paraformaldehyd + 1 ml 1 M NaOH bei 60 Grad Celsius, + 10 ml 10 x PBS, und filtrieren mit 1 M HCl pH 7,4 einstellen, 100 ml mit H ₂ O auffüllen
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	0,1-0,2 Prozent Triton X-100, 5 Prozent NGS
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 , 0,02 Prozent Nonidet-P40 in 1 x PBS Natrium-Deoxycholate, 0,02 Prozent Paraformaldehyd
X-Gal-Lösung	40 mg X-Gal (Roth Kat Nr. 2815.3) in 1 ml DMSO
Weitere Lösungen	
Ketamin-Xylazin-Mix	20 ml Ketamin (Konzentration 50 mg/ml) + 2,5 ml Xylazin (2 Prozent) in 77,5 ml 0,9 Prozent NaCl-Lösung (isotonische Kochsalzlösung)
Rimadyl-Lösung	800 Mikroliter Carprofenlösung in 100 ml isotonische Kochsalzlösung (0,9 Prozent NaCl)
NaCl/Benzylalkohol-Mix	0,9 Prozent Benzylalkohol in isotonische Kochsalzlösung (0,9 Prozent NaCl, Minogue und Sun 2005)

C.2.5 PCR-Analyse gentechnisch veränderter Tierstämme

Die benötigten Oligonukleotide für die Polymerase-Kettenreaktion („Polymerase Chain Reaction“, PCR) wurden von den Firmen Sigma-Genosys (Steinheim, Deutschland) und Metabion (München, Deutschland) bezogen (Tabelle 7).

Tabelle 7: Für die Genotypisierung der PRG-1-ko und PRG-1-cko wurden die hier aufgeführten Primerkonstrukte genutzt (Trimbuch 2009)

PRG-1-ko und PRG-1-cko = „plasticity related gene 1 knock out“ und „conditional knock out“, PCR = „Polymerase Chain Reaction“, Fw = „forward“, Rev = „reverse“, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin, A = Adenin

Verwendung	Primerkonstrukte (Name)	Sequenz (5'-3')
Genotypisierung PRG-1-ko	Neo-gPCR-Fw (1)	GGG CTG ACC GCT TCC TCG TGC TTT AC
	PRG-1-gPCR-Fw (2)	CCG TGA TTG CTT GTT CCT TCT AGT GTG
	PRG-1-gPCR-Rev (3)	TCC GGG ATG TGC ACC AAT TGG GAA GAG
Genotypisierung PRG-1-cko	PRG-1-cko-gPCR-Lox1-Fw (1)	CCC TGT TAA GAA TTG ACC
	PRG-1-cko-gPCR-Lox1-Rev (2)	GAC ATG ACA CAA ATA TCA GGG
	gPCR PRG-1-cko -/- fw (3)	GTT ATG TTG CAC TTA CAT ATC AGT GTA G
	gPCR PRG-1-cko -/- rev (4)	CAC ACA CAG TGC TTA CTT TAA GAC TG

C.2.6 Antikörper

Für die histologische Auswertung transfizierter Gewebe wurden Kombinationen aus primären und sekundären Antikörpern genutzt. Bei Transfektionen von Plasmiden mit codierten Fluoreszenzproteinen wurden sekundäre Antikörper gewählt, die im gleichen Wellenlängenbereich messbar waren. Damit konnte, wenn nötig, die Fluoreszenz für die Analyse verstärkt werden (Tabelle 8 und Tabelle 9). Es wurden primäre und sekundäre Antikörper von Abcam (Cambridge, Großbritannien), Millipore Corporation (in Kooperation mit Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), Molecular Probes® (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland), antibodies-online GmbH (Aachen, Deutschland) und Jackson ImmunoResearch Laboratories (Newmarket, Großbritannien) angewendet.

Tabelle 8: Für die Immunhistochemie verwendete Primärantikörper

Ig = Immunglobulin, DsRed2 = 2. Variante des rot fluoreszierenden Proteins („Red“) aus *Discosoma sp.* (E)GFP = („Enhanced“/verstärktes) grün fluoreszierendes Protein aus *Aequorea victoria*

Primärer Antikörper	Hersteller	Isotyp	Herkunft (Spezies)	Klonalität	Verdünnung
Anti-Beta-Galaktosidase	Abcam	IgG	Kaninchen	poly	1:1000
Anti-GFP	Abcam	IgG	Kaninchen	poly	1:1000
Anti-GFP	Abcam	IgG	Ziege	poly	1:1000
Anti-DYKDDDDK (FLAG® epitope tag)	Millipore Corporation	IgG1	Maus	mono	1:1000
Anti-Red Fluorescent Protein (DsRed)	antibodies-online GmbH	IgG1	Maus	mono	1:1000

Tabelle 9: Für die Immunhistochemie verwendete Sekundärantikörper

Cy = „Cytochrome“, Ig = Immunglobulin

Sekundärer Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Alexa Fluor® 488 Ziege Anti-Kaninchen IgG	Molecular Probes (Invitrogen)	1:1000
Alexa Fluor® 568 Ziege Anti-Kaninchen IgG	Molecular Probes (Invitrogen)	1:1000
Cy TM 3 Ziege Anti-Kaninchen IgG	Jackson Immuno Research	1:1000
Alexa Fluor® 488 Ziege Anti-Maus IgG	Molecular Probes (Invitrogen)	1:1000
Alexa Fluor® 568 Ziege Anti-Maus IgG	Molecular Probes (Invitrogen)	1:1000
Cy TM 3 Ziege Anti-Maus IgG	Jackson Immuno Research	1:1000
Alexa Fluor® 488 Esel Anti-Ziege IgG	Molecular Probes (Invitrogen)	1:1000
Alexa Fluor® 568 Esel Anti-Ziege IgG	Molecular Probes (Invitrogen)	1:1000

C.2.7 Fertigsets

Für die Genotypisierung der gentechnisch veränderten Mauslinien wurden das „GoTaqTM DNA Polymerase Set“ der PROMEGA GmbH (Mannheim, Deutschland) und das „Invisorb® Spin Tissue Mini Kit“ von Invitek (Berlin, Deutschland) genutzt. Das „EndoFree Plasmid Maxi Kit“ von QIAGEN (Hilden, Deutschland) wurde zur Präparation der endotoxinfreien Plasmidmischungen angewendet. Vor Injektion wurde die Plasmidmischung mit „Fast Green FCF“ (Carl Roth®, Karlsruhe, Deutschland) kombiniert. Weiterhin wurde mit dem Plasmidpräparations-Set NucleoBond® von MARCHEREY-NAGEL (Düren, Deutschland) gearbeitet. Alle genutzten Fertigsets wurden nach den von den Firmen vorgegebenen Protokollen gehandhabt.

C.3 Methoden

Neben den unter Abschnitt C.1.1 erwähnten gesetzlichen Vorschriften und Regeln wurde zusätzlich bei allen hier gezeigten Methoden das Arbeitsschutzgesetz beachtet (ArbSchG vom 07.08.1996, zuletzt geändert durch Artikel 8 des Gesetzes vom 19. Oktober 2013).

C.3.1 Methode der *In-utero*-Elektroporation

Vor Beginn der Operation wurden die terminiert verpaarten, trächtigen Mäuse (*p.c.* = Tag 0 entspricht 12 Stunden nach Zusammensetzung des Zuchtpaares) im Alter zwischen 8 und 13 Wochen durch ein Ketamin-Xylazin-Gemisch (100 Mikroliter je 10 Gramm Körpergewicht, siehe Abschnitt C.2.4) anästhesiert. Zur Feststellung des Anästhesiestadiums wurden die

messbaren Reflexe zur Beurteilung des Narkosestadiums nach Vorlage der Beobachtungskriterien während der Narkose von Guedel kontrolliert (Guedel 1951).

Sobald die Maus das chirurgische Toleranzstadium erreicht hatte, wurden mit einer Salbe (Bepanthen®, Bayer-Gruppe, Berlin, Deutschland) die Augen abgedeckt. Somit konnte eine Austrocknung der Augen durch den eingeschränkten Lidschluss verhindert werden. Eine Immobilisation durch die Fixierung der Gliedmaßen war notwendig, da eine Gefährdung des gesamten Eingriffs und des Wohlbefindens des trächtigen Tieres durch ungewollte Bewegungen bestand. Dafür wurde die Maus in Rückenlage mittels Schlingen oder Hautklebeband an den äußeren Extremitäten vorsichtig befestigt (Abbildung 5 A).

Das Operationsfeld wurde anschließend im Bereich des Abdomens großzügig mit 70 Prozentigem vergälltem Alkohol gereinigt und desinfiziert. Zur Vorbereitung einer besseren Lagerung der Uterushörner mitsamt Früchten wurde beidseitig der Maus sterile Gaze ausgelegt. Zusätzlich wurde der Großteil der Maus durch eine Gaze abgedeckt und nur ein halbmondförmiger Ausschnitt im Bereich der Operationsstelle freigelassen (Abbildung 5 B). Der Randbereich des Ausschnitts wurde mit bakteriostatischem NaCl/Benzylalkohol-Mix (siehe Tabelle 6) befeuchtet.

Die Operation begann mit einem 1,5-2 Zentimeter langen Hautschnitt in der abdominalen Medianebene vor dem inguinalen Milchdrüsenkomplex in kranialer Ausrichtung (Abbildung 5 C, oberes Bild). Die darunter liegende Muskelschicht wurde 1-1,5 Zentimeter entlang der Bindegewebsnaht (*Linea alba*) im unteren Bereich des Abdomen aufgetrennt (Abbildung 5 C, unteres Bild).

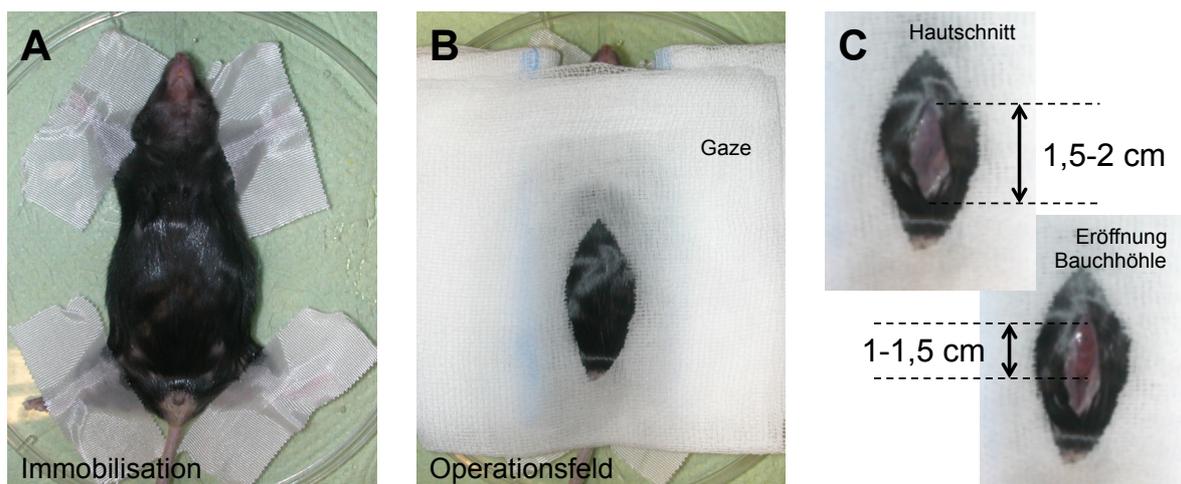


Abbildung 5: Fotografien der ersten Teilschritte der *In-utero*-Elektroporationstechnik

Nach der Einleitung der Anästhesie wurden die Mäuse in Rückenlage fixiert (A). Der Abdomen wurde mit 70-prozentigem Alkohol desinfiziert. Das Operationsfeld war nach der Abdeckung mit Gaze zu erkennen (B). Der Rand der Gaze um das Operationsfeld herum wurde mit NaCl/Benzylalkohol-Mix befeuchtet. Es erfolgte der Hautschnitt (C, oberes Bild) und der Muskelschnitt (C, unteres Bild) in der abdominalen Medianebene (Baumgart und Grebe 2015).

Die beiden mit Embryonen bestückten Uterushörner wurden mithilfe spezieller Ringpinzetten (Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland) herausgelagert und auf die befeuchtete Gaze seitlich der Operationswunde abgelegt. Dabei war darauf zu achten, dass weder Blutgefäße noch die Placenta lädiert wurden. Um dies zu gewährleisten, wurde der Uterus zwischen den Embryonen von der antimesometrialen Seite ergriffen. Die inneren Organe des tragenden Weibchens wurden permanent mit dem NaCl/Benzylalkohol-Mix nach Eröffnung der Bauchhöhle befeuchtet.

Es wurden durch wenige Manipulationen die Embryonen in eine Lage gebracht, die eine unkomplizierte und schnelle Injektion mit den Kapillaren gewährleistete. Damit die Plasmidtransfektionen ohne unnötige Gewebeschäden möglich waren, wurden die Koordinaten der Injektionsstelle mithilfe anatomischer Literatur bestimmt (Theiler 1989; Jacobowitz 1997; Rossant 2002; Schambra 2008). Die Pfeil- (*Sutura sagittalis*) und die Lambdanaht (*Sutura lambdaidea*) waren gut sichtbar und dienten, wie die ebenfalls gut erkennbare Augenanlage, der Orientierung. Die unter C.2.2 aufgeführten Plasmide wurden mit einer Mundpipette (Bio-medical Instruments, Zöllnitz, Deutschland) gleichmäßig und gewebeschonend im größten Volumenquerschnitt der lateralen Ventrikel der Maus injiziert (Abbildung 6 B). Die Koordinaten der Injektionsstelle waren z. B. bei E14 alte Embryonen in rostraler Ausrichtung 0,75 Millimeter von der Lambdanaht und lateral 0,5 Millimeter zur Pfeilnaht entfernt (Abbildung 6 A). Die Injektionstiefe betrug 0,5 Millimeter. Die Plasmidlösung wurde zur visuellen Kontrolle mit dem grün-bläulichen Proteinfarbstoff „Fast Green FCF“ (Carl Roth®, Karlsruhe, Deutschland) zugesetzt. Das zu injizierende Volumen der Plasmidlösung war abhängig von dem Embryonalalter. Bei jungen Embryonen (E11, *p.c.*) waren 0,5 Mikroliter, bei älteren (E17, *p.c.*) bis zu 3 Mikroliter Plasmidlösung je Ventrikel in einer Konzentration von 3-4 Mikrogramm je Mikroliter möglich. Nach einer erfolgreichen Injektion der Mischung hob sich die Kontur der lateralen Ventrikel durch den Farbstoff ab (Abbildung 6 B, unteres Bild).

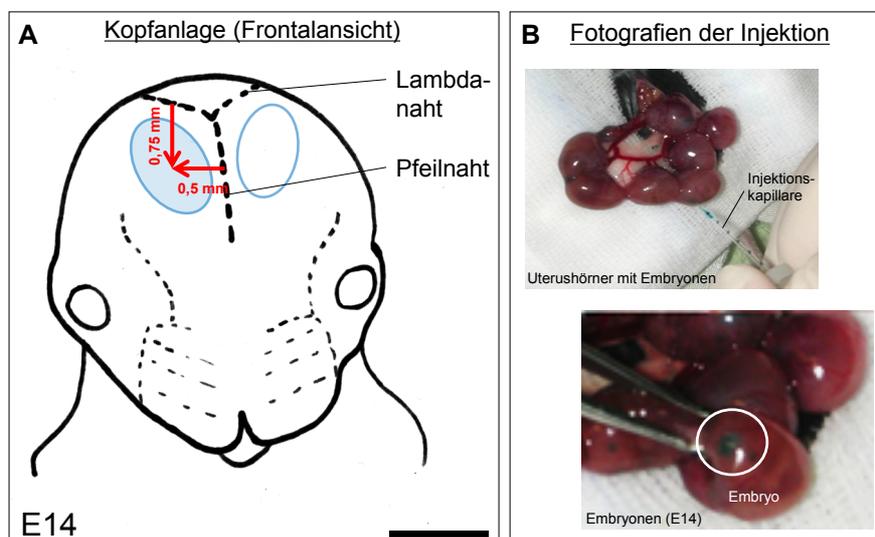


Abbildung 6: Ansicht der Plasmidinjektionsstelle am Embryo (Maus)

Abbildung (A) zeigt die grafische Darstellung der Koordinaten (Schnittpunkt 0,5 Millimeter lateral von der Pfeilnaht und 0,75 Millimeter in rostraler Richtung von der Lambdanaht) der Injektionsstelle aus frontaler Ansicht (E14, Messbalken = 1 Millimeter). Bild (B) zeigt Fotografien der Plasmidinjektion in den lateralen Ventrikel (oberes Bild). Nach erfolgreicher Transfektion hebt sich die Kontur des Ventrikels durch den Farbstoffzusatz „Fast Green FCF“ deutlich ab (weißer Kreis, unteres Foto).

Für die eigentliche Transfektion wurde ein Stromfluss benötigt, der durch Spezialelektroden aus Platin (CUY 650P, Nepagene, Ichikawa, Japan) geleitet wurde. Die Großhirnanlage bei 12 Tage alten Mausembryonen (E12, *post conceptionem* (*p.c.*)) ist ungefähr 1,5 Millimeter groß (Abmessung Länge vom Riechhirn bis einschließlich Kleinhirn) und nimmt bei 17 Tage alten Embryonen (E17, *p.c.*) bereits Maße von 5 Millimeter und mehr an (Schambra et al. 1991). Daher wurde der Durchmesser der Elektroden der anatomischen Größe der Kopfanlage bzw. der des Ventrikelsystems angepasst. Die jüngsten zu elektroporierenden Entwicklungsstadien (E12, *p.c.*) wurden mit einer im Durchmesser 0,5 Millimeter großen Elektrode (CUY 650 0,5, NEPA GENE Co., Japan) elektroporiert. Die nachfolgenden Stadien E13 und E14 (*p.c.*) wurden mit einer im Durchmesser 3 Millimeter großen, die Stadien E15 und E16 (*p.c.*) mit einer 5 Millimeter großen Flachelektrode (CUY 650 3 und 5, NEPA GENE Co., Japan) manipuliert. Bei der Elektroporation des Embryonalstadiums E17 (*p.c.*) wurde mit der im Durchmesser 5 Millimeter und 10 Millimeter großen Elektrode gearbeitet (CUY 650 5 und 10, NEPA GENE Co., Japan). Das benötigte Spannungsfeld für diese Elektroden wurde durch Elektroporatoren, wie den Nepagene CUY 21 (Nepagene, Ichikawa, Japan) oder den BTX ECM 830 (Harvard Apparatus Inc., Holliston, Massachusetts, USA) hergestellt. Die Elektroden wurden so ausgerichtet, dass der positive Leiter die injizierte, negativ geladene DNS in die erwünschte Richtung im ZNS leitete (Abbildung 7 A). Bei der Elektroporation wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasenbildung zwischen der Elektrode und dem Gewebe entstand.

Nach durchgeführter Plasmidinjektion und Elektroporation (Bezeichnung: *In-utero*-Elektroporation oder Transfektion) wurden die Uterushörner wieder in die Bauchhöhle verlagert. Die Operationswunde in der Muskelschicht der Bauchdecke wurde durch eine fortlaufende Naht (PERMA-Handseide, ETHICON®, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) verschlossen (Abbildung 7 B). Anschließend erfolgte ebenfalls durch eine Naht der Verschluss der eröffneten Haut im abdominalen Bereich der Maus (Abbildung 7 C).

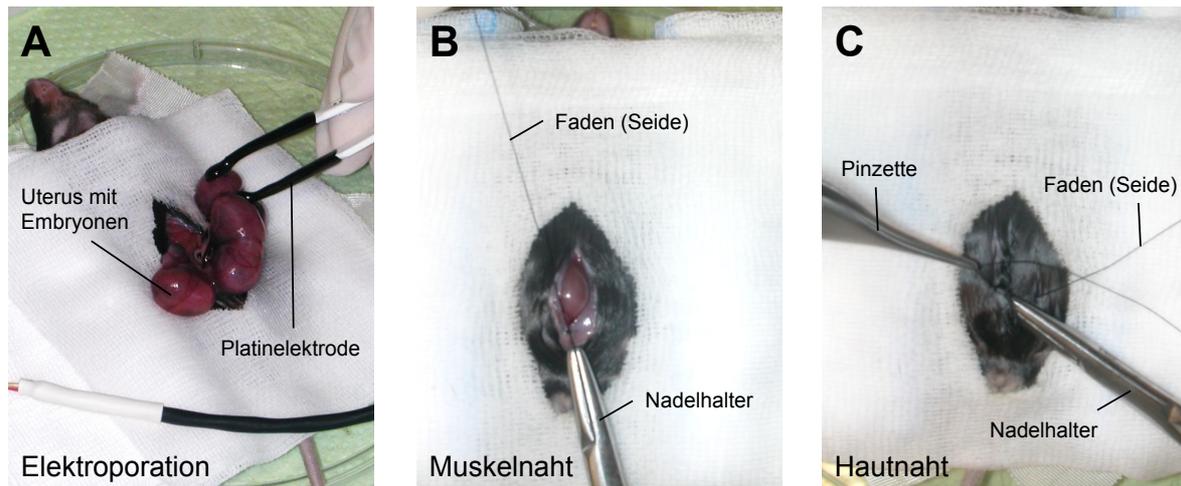


Abbildung 7: Elektroporation und Wundversorgung bei der *In-utero*-Elektroporation

(A) Durch die Positionierung des Pluspols der Platinelektroden konnte der Stromfluss und damit die Richtung der zu transfizierenden negativ geladenen DNS vorgegeben werden. Nach Abschluss der Transfektion der Embryonen wurden diese durch vorsichtige Rückverlagerung des Uterus wieder in die Bauchhöhle verbracht. Durch chirurgische Nähte wurden die (B) Bauchmuskelschicht und die (C) Hautschicht an der Operationswunde verschlossen (Baumgart und Grebe 2015).

Die analgetische Wirkung von Ketamin wurde durch die Gabe eines subkutanen Depots mit dem Wirkstoff Carprofen (Rimadyl-Lösung, 100 Mikroliter je 10 Gramm Körpergewicht) für 24 Stunden weitergeführt. Während der Operation befand sich die Maus auf einer Heizplatte, die mit einem rektalen Thermofühler eine konstante Körpertemperatur von 38 Grad Celsius regulierte. Nach der Operation wurde die Maus in der Aufwachphase auf eine 35-37 Grad Celsius warme Heizplatte verbracht. Auf diese Weise wurde eine Auskühlung des Tierkörpers vermieden.

C.3.2 Perfusionsfixierung

Für die immunhistochemischen Auswertverfahren wurden operierte, terminiert verpaarte Mäuse (Analyse von Embryonalstadien) oder transfizierte Tiere (postnatal) mittels transkardialer Perfusion fixiert. Es handelt sich dabei um ein Verfahren, das zum vollständigen Ersatz des Blutes eine mit Überdruck erfolgte Infusion isotonischer Kochsalzlösung nutzt. Nach dem Entbluten des Tieres erfolgt die Fixation mit Formalinlösung (4-prozentige Paraformaldehyd-Lösung).

Vor dem Eingriff wurden die trächtigen (bis E19) und die transfizierten Mäuse (bis P21) mit dem Ketamin-Xylazin-Mix (Tabelle 6) anästhesiert. Aufgrund des finalen Eingriffs durch die Perfusionsfixierung sollte ein Anästhesiestadium der Depression durch Überdosierung des Anästhetikums erreicht werden (200 Mikroliter je 10 Gramm Körpergewicht, s.c. oder i.p.).

Sobald die Maus das Stadium erreicht hatte, wurde die Haut im oberen Brustkorbbereich großzügig abgetrennt. Lateral im Bereich des Übergangs von der knöchernen in die knorpelige Struktur der Rippen (*Articulationes costochondrales*) wurde beidseitig der Brustkorb eröffnet und das Sternum mit den knorpeligen Rippenanteilen entfernt. Auf diese Art und Weise wurde das darunter liegende Herz freipräpariert. Mittels einer Venenverweilkanüle (Braunüle®, B | BRAUN, Melsungen, Deutschland) wurde die Herzspitze durchstoßen und ein Zugang zur linken Herzkammer gelegt. Der rechte Herzvorhof wurde mithilfe eines Scheuerschnitts eröffnet. Es erfolgte über die Kanüle eine langsame Infusion von angewärmter isotonischer Kochsalzlösung (Tyrode, 37 Grad Celsius) in gleichmäßig verabreichten Volumeneinheiten (2-5 Milliliter je Minute).

Bei erfolgreicher Entblutung zeigte sich eine Aufhellung der Leberlappen. Danach konnte durch den Wechsel der Infusionsflüssigkeit (4-prozentiges PFA, Gabe desselben Volumenanteils und derselben Geschwindigkeit der vorab gegebenen Kochsalzlösung) das Gewebe der Maus fixiert werden. Im Anschluss erfolgte die Dekapitation und das Gehirn wurde vorsichtig vom großen Hinterhauptloch (*Foramen occipitale magnum*) an freipräpariert. Das präparierte Gehirn wurde 2 Tage in 4-prozentige PFA-Lösung (Formalinlösung) nachfixiert, bevor es am Vibratom geschnitten werden konnte. Für eine längerfristige Lagerung der fixierten Gehirne wurde die PFA-Lösung durch PB-Lösung (Molarität 0,1) getauscht.

Für spätere Schnitte vom Kryostaten wurden die fixierten Gehirne in Saccharose-Lösungen mit aufsteigender Konzentration (1. Tag 10-prozentige, 2. Tag 20-prozentige und 3. Tag 30-prozentige Saccharose-Lösung) überführt.

C.3.3 Molekularbiologische Arbeiten

C.3.3.1 Genotypisierung der PRG-1-ko- und PRG-1-cko-Mäuse

Die Isolierung genomischer DNS erfolgte mittels Gewebe vom Ohr oder von der Schwanzspitze. Für die Genotypisierung wurde das „Invisorb® Spin Tissue Mini Kit“ (Invitex, Berlin, Deutschland) zur Aufbereitung der DNS genutzt. Die transgenen Mausstämme PRG-1-ko (Tabelle 10) und PRG-1-cko (Tabelle 11) wurden auf diese Weise analysiert.

Tabelle 10: Allgemeiner Ablauf der PCR-Programme zur Amplifizierung der DNS von PRG-1-ko (Wdh. = Wiederholung)

PCR-Programm	Temperatur (Grad Celsius)	Dauer (min)	Bemerkungen	
1	95	3	initiale Denaturierung	
2	95	0,5	} Wdh. 30 x	Denaturierung
3	63	0,5		„Annealing“
4	72	0,5		Elongation
5	72	5	End-Elongation	
6	4	∞	Abkühlen	

Tabelle 11 Allgemeiner Ablauf der PCR-Programme zur Amplifizierung der DNS von PRG-1-cko

(Wdh. = Wiederholung)

PCR-Programm	Temperatur (Grad Celsius)	Dauer (min)	Bemerkungen	
1	95	3	initiale Denaturierung	
2	95	0,5	} Wdh. 30 x	Denaturierung
3	58	0,5		„Annealing“
4	72	0,25		Elongation
5	72	5	End-Elongation	
6	4	∞	Abkühlen	

Das Probenmaterial wurde mit 400 Mikroliter Lysepuffer, versetzt mit 40 Mikroliter Proteinase K, für 1 Stunde bei 57 Grad Celsius in einem Thermomixer inkubiert. Alternativ wurde diese Reaktion im Wasserbad (52 Grad Celsius) über Nacht durchgeführt. Das Reaktionsgefäß wurde bei 18800-facher Erdbeschleunigung 1 Minute lang zentrifugiert, um unverdautes Material (Wirbelkörper, Haare) von dem abzukantierenden Überstand zu trennen. Nun erfolgte die Aufbereitung nach dem Invitek®-Protokoll. Dem Überstand wurden 200 Mikroliter Bindepuffer hinzugegeben und anschließend auf dem Filter 1 Minute lang inkubiert. Die in der Säule gebundene DNS wurde durch die Zugabe von 500 Mikroliter Waschpuffer gereinigt. Der Filter wurde bei 11600-facher Erdbeschleunigung für 2 Minuten von den Waschpufferresten befreit. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 50 Mikroliter Eluierungspuffer (50 Grad Celsius, 3 Minuten). Durch Abzentrifugieren wurde die genomische DNS aus der Probe gewonnen. Aus diesem Ansatz wurde das Probenmaterial für die anschließende PCR genutzt (1-2 Mikroliter je Probe).

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt definierte DNS-Sequenzen durch den Einsatz von Primern (Oligonukleotide, Tabelle 7) und einer Polymerase (hitzestabil). Die Primer sind Komplementärstränge der Einzelstränge der zu amplifizierenden Genabschnitte. Durch eine Erhöhung der Temperatur (95 Grad Celsius) kommt es zur Denaturierung. Anschließend wird bei niedrigeren Temperaturen (55-65 Grad Celsius) die Anlagerung der Primer veranlasst („Annealing“). Es kommt zum Synthetisieren neuer Stränge durch die Polymerase (68-72 Grad Celsius). Der Probenansatz für eine Analyse mittels PCR war 1 Mikroliter aufgereinigte DNS in 24 Mikroliter Reaktionsgemisch aus 1 Mikroliter Primer „Rev“ (100 pico Mol je Liter), 1 Mikroliter Primer „Fw“ (100 pico Mol je Liter), 5xGoTaq™ DNS Polymerase, 1-5 Internationale Einheiten GoTaq™-Polymerase (Promega) und Template DNS (100-200 Nanogramm).

C.3.3.2 Restriktionsverdau

Zur einfachen Überprüfung der Vervielfältigung und Aufreinigung der Plasmide wurden Analysen mit Restriktionsverdau durchgeführt (Tabelle 4).

Die Restriktionsenzyme (5-20 Internationale Einheiten je Mikroliter, 0,5-5 Mikroliter Enzymlösung) und 10-x-Puffer (NEB, New England Biolabs) wurden in einem Mix mit den Plasmiden bei 37 Grad Celsius 1 Stunde inkubiert. Anschließend erfolgte die Auftragung auf ein Agarosegel.

C.3.3.3 Gel-Elektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung der DNS-Abschnitte (Genotypisierung, Restriktionsverdau) wurden die Proben in 0,7-2 Prozent Agarosegel, eingebettet in 1-x-TBE-Puffer, in vorgefertigte Taschen gegeben.

Dazu wurde 1 Gramm Agarose in 100 Milliliter H₂O bei plus 60 Grad Celsius gelöst. Während der Abkühlungsphase wurden 0,3 Mikrogramm Ethidiumbromid mit eingemischt. Damit war gewährleistet, dass die DNS unter UV-Licht sichtbar wird. Das angewärmte Gel wurde in die Gelkammer (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) gegossen und war nach Abkühlung für die Beladung der Proben (mit Ladepuffer) vorbereitet.

Die angelegte Spannung (Netzgerät EV202, Consort, Turnhout, Belgien) betrug 70-130 Volt (0,5-5 Stunde) und nach ausreichender Fragmenttrennung konnte der Gellauf gestoppt werden. Zur Abmessung der Größe der DNS-Abschnitte wurden gleichzeitig die Größenmarker

FastRuler™ („low range“) und O´Gene-Ruler™ („ready-to-use“) der Firma Fermentas (Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Deutschland) benutzt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf einen Transilluminator gelegt, fotografiert und ausgewertet.

C.3.3.4 Konzentrationsbestimmung von DNS-Abschnitten und Plasmiden

Die Konzentrationsmessung wurde mithilfe des Photometers Ultraspec 1000 und 2000 (Pharmacia Biotech, Cambridge, Großbritannien) in einer Wellenlänge von 260 (DNS-Absorption) und 280 Nanometer (Protein-Absorption) gemessen. Dazu wurde die DNS-Lösung in aufgereinigtem Wasser (Millipore II) verdünnt, bis ihre Extinktion unter 1 war. Dabei entspricht der Absorptionswert 1 gleich 50 Mikrogramm je Milliliter Konzentration. Durch die Messung der DNS-Absorptionswerte konnte mit der Formel

$$c = \frac{(\text{Absorption} \times \text{Verdünnung} \times 50)}{1000}$$

die Endkonzentration des Lösungsansatzes berechnet werden.

Die optische Dichte (oD) entspricht dem Reinheitsgrad der DNS-Lösung in Hinblick auf Proteinkontaminationen. Sie wird durch die Differenz der Absorptionswerte zwischen 260 und 280 Nanometer Wellenlänge bestimmt:

$$oD = \frac{A(260 \text{ nm})}{A(280 \text{ nm})}$$

Der Wert musste bei DNS zwischen 1,8 und 2,0 liegen, damit die Probe als „rein“ einzustufen war.

C.3.3.5 Plasmid-Transformation in *E. coli* und Gewinnung einer Bakterienbouillon

Tiefgefrorene, hitzekompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 1 Mikroliter Plasmid-DNS (0,1-1 Mikrogramm je Mikroliter) vorsichtig gemischt und für weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen in einem Wärmeblock 30 Sekunden lang auf 42 Grad Celsius erhitzt, um dann 2 Minuten lang wieder auf Eis inkubiert zu werden. Mit einer Zugabe von 900 Mikroliter DYT-Medium (oder LB-Medium) wurde der Mix bei 37 Grad Celsius 1 Stunde lang inkubiert. Die Bouillon wurde bei 18800-facher Erdbeschleunigung zentrifugiert und das entstandene Pellet in 250 Mikroliter neu angesetztem DYT-Medium (oder LB-Medium) resuspendiert.

Die Nährlösung mit den Bakterien wurde auf Medienplatten, die mit den gewünschten Antibiotikum behandelt wurden, ausplattiert. Es folgte eine Inkubationszeit von 12-24 Stunden bei 37 Grad Celsius.

Ausgewählte Kolonien wurden in 10 Milliliter DYT-Medium (oder LB-Medium), versetzt mit Antibiotikum, für 6 Stunden inkubiert. Dem Medium wurden in einzelnen Portionen je 850 Mikroliter Volumen abgezogen und mit 150 Mikroliter Glycerin versetzt. Aus dieser Probe konnte man zusätzlich die DNS durch Aufreinigung gewinnen und mittels Kontrollverdau die Richtigkeit des Plasmids bestätigen. Die Proben wurden bei minus 80 Grad Celsius gelagert und dienten der Anzucht der Plasmidpräparationen.

C.3.3.6 Plasmidpräparation

Zur Anzucht der Bakterienkolonien, die das gewünschte Plasmid in sich trugen, wurden 100-200 Milliliter DYT-Medium (oder LB-Medium) mit einer Probe (Kolonie, Stück der gefrorenen Bakterienbouillon) und dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und über Nacht bei 37 Grad Celsius inkubiert. Die Aufbereitung der Plasmide erfolgte mit dem QIAGEN „Maxi-Kit endofree“.

Die über Nacht gewachsenen Zellen wurden in 50-Milliliter-Röhrchen abzentrifugiert (3800-facher Erdbeschleunigung, 4 Grad Celsius, 15 Minuten). Nach Abkantieren des Überstandes erfolgte die Resuspendierung der einzelnen Pellets in 10 Milliliter Puffer 1, dem nach Lösen weitere 10 Milliliter Puffer 2 für die Zelllysis zugegeben wurden. Das Volumen wurde um weitere 10 Milliliter mit Puffer 3 für die Präzipitation der bakteriellen chromosomalen DNS und der Zelltrümmer, die bei diesem Schritt durch Zentrifugation (12800-facher Erdbeschleunigung, 4 Grad Celsius, 15 Minuten) und Filterung entfernt wurden, erhöht. Nach der Zugabe des „Endotoxinremoval-Puffers“ wurde die Präparation 30 Minuten auf Eis gekühlt. Der gewonnene Überstand wurde auf eine Tip-500-Säule zur Bindung der Plasmid-DNS gegeben und nach erfolgten Waschschritten durch Puffer QN wurde die DNS eluiert. Das Filtrat wurde mit 0,7-fachem Volumen Isopropanol gemischt, wodurch es zur Ausfällung der Plasmid-DNS kam. Das Pellet wurde durch Zentrifugation mit anschließender Abkantierung und Trocknung gewonnen. Der letzte Schritt war die Lösung der Pellets in TE-Puffer. Aus dieser Lösung konnte zusätzlich die DNS-Menge zur Konzentrationsmessung (Abschnitt C.3.3.4) und zum Kontrollverdau gewonnen werden.

C.3.4 Histologie und Immunohistologie

C.3.4.1 Gewebeschnitte

Die Herstellung von Gewebeschnitten (E12 bis P21) aus dem Großhirn der manipulierten Mäuse erfolgte über 2 Methoden: mittels Kryostat (Modell: Leica CM1900, Leica, Bensheim, Deutschland) oder durch ein Vibratom (Modell: HM 650 V, MICROM International GmbH, Walldorf, Deutschland).

Voraussetzung zur Erstellung von Gefrierschnitten war die Einbettung der transfizierten Gehirne in kälteprotektiven Lösungen, bevor sie in der Gasphase von flüssigem Stickstoff oder auf Trockeneis eingefroren wurden. Dazu wurden die in Formalinlösung (4 Prozent PFA) fixierten Gehirne jeweils 1 Tag in 10-, 20- und 30-prozentiger Saccharose-Lösung aufsteigend umgeben. Das Gewebe wurde am 4. Tag, nach Absinken in Tissue-Tek® (OCT Sakura, Alphen aan den Rijn, Niederlande), in der Gasphase von Flüssigstickstoff bei minus 180 bis minus 80 Grad Celcius erkaltet. Die weiterführende Lagerung der Proben erfolgte bei minus 80 Grad Celsius bis zur Verarbeitung am Kryostat. Die Gehirne wurden mit dem Tissue-Tek® auf einem vorgekühlten Tisch fixiert. Die Schnittdicke betrug 10 bis 40 Mikrometer (Leica CM1900, Bensheim, Deutschland).

Zur Aufarbeitung der Gewebe mit dem Vibratom konnten Gehirne nach Perfusion in PB (Molarität 0,1) überführt werden. Mithilfe von Gewebekleber wurden die Gehirne auf Vibratom-Tischchen fixiert und ins Schneidebecken (gefüllt mit 4-7 Grad Celsius gekühlten PB, Molarität 0,1) überführt.

Gehirne von 5 Tage alten Jungtieren (P5, *p.p.*) oder jünger wurden in Agarblöcke eingebettet, da sonst eine Fixierung auf dem Vibratom-Tischchen nur mit größeren Gewebeschäden möglich war. Dazu wurde „low melt Agar“ (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) mit PB-Lösung (Molarität 0,1) versetzt in einer Mikrowelle bei 300-600 Watt erhitzt und in vorgefertigte Formen gegossen. Während der Abkühlungsphase wurden die Gehirne in dem Agar eingebettet. Sobald der Agarblock abgekühlt und fest war, konnte das eingebettete Gehirn samt Agar geschnitten werden. In Agarblöcke eingeschlossene Gewebe von sehr jungen Embryonalstadien (E15-E17, *p.c.*) wurden für weitere 24 Stunden in 4-prozentigem PFA (Formalinlösung) nachfixiert. Damit konnte eine bessere Schnittfestigkeit der Probe garantiert werden.

Vorgaben für Vibratomschnitte:

- 50-70 Mikrometer Schnittdicke
- eine Frequenz von 47-60 Hertz
- Geschwindigkeit der Klinge mit Stufe 10-15
- 0,7 Mikrometer große Amplitude der Klingenschwingung

C.3.4.2 X-Gal-Färbung von Gewebeschnitten

Durch die X-Gal-Färbung (5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -D-Galactopyranosid) kann die bakterielle Beta-Galaktosidase, die durch das *lacZ*-Gen exprimiert wird, nachgewiesen werden. Aufgrund der enzymatischen Fähigkeit kann die Galaktosidase den X-Gal-Farbstoff durch hydrolytische Spaltung in Galaktose und 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl auftrennen. 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl wird in Anwesenheit von Oxidationsmitteln (X-Gal-Färbepuffer) zu 5,5'-Dibrom-4,4'-Dichlor-Indigo, ein blauer Farbstoff, oxidiert.

Eine zu lange Fixierung in 4-prozentigem PFA (Formalinlösung) führt zum Aktivitätsverlust von Enzymen und damit auch zum Aktivitätsverlust der Beta-Galaktosidase. Aus diesem Grund wurden die Gehirne, die für die X-Gal-Färbung zugeordnet wurden, nur 2 Stunden lang in Formalinlösung (PFA, 4 Prozent) fixiert, bevor sie in PB (Molarität 0,1) eingebettet wurden. Die Schnitte wurden am Vibratom (50-70 Mikrometer) angefertigt und mit der X-Gal-Lösung in 1:2000-Verdünnung in den X-Gal-Färbepuffer gegeben (30 Minuten, 37 Grad Celsius, Tabelle 6). 3 aufeinanderfolgende Waschschrte durch Umbettung der Schnitte in neu angesetztes PB (Molarität 0,1 M, je Waschschrte 5-10 Minuten) haben die Substratausgangslösung entfernt. Nachdem die Schnitte auf Objektträger gezogen wurden, durchliefen die Präparate eine Entwässerung unter einer Alkoholreihe (5 Minuten, 70 Prozent; 5 Minuten 80 Prozent, 2 x 5 Minuten 96 Prozent, 2 x 5 Minuten Xylol). Die Einbettung der Schnitte zwischen Objektträger und Deckgläschen erfolgte mit angewärmter Glycerolgelatine (Millipore Corporation (in Kooperation mit Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) oder mit ProLong Gold® (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland).

C.3.4.3 Fluoreszenzmarkierung von Gewebeschnitten

Der Ablauf der immunhistochemischen Färbeschritte war bei Gewebeschnitten vom Kryostaten und Vibratom annähernd gleich. Aufgrund der geringeren Dicke bei Schnitten, die mit dem Kryostat hergestellt wurden, konnten die entsprechenden Antikörper über einen kürzeren Zeitraum inkubiert werden.

Die Schnitte wurden in 12-Well-Platten (5 Schnitte je Well) gesammelt und mit Blockierungslösung (500 Mikroliter, siehe Tabelle 6) für 1 Stunde bei Raumtemperatur gelagert. Im Anschluss wurden die Schnitte über Nacht bei 4 Grad Celsius (Schnitte vom Kryostat 2-6 Stunden bei Raumtemperatur) mit den primären Antikörpern (250-500 Mikroliter je Well) inkubiert. Es folgten 3-5 Waschschrte mit neu angesetztem PB (0,1 M, je Waschschrte 5-10 Minuten). Bei der Nutzung mehrerer primärer Antikörper wurden diese zusammen in dem Schritt nach der Blockierungslösung (Tabelle 6) inkubiert. Nach der Waschung (Umbettung in neu angesetztes PB (Molarität 0,1, je Waschschrte 5-10 Minuten) der Schnitte erfolgte die Färbung mit dem ersten sekundären Antikörper. Sind mehrere sekundäre Antikörper zur Nutzung gekommen, so wurden sie einzeln mit zwischengestellten Waschschrten inkubiert (Inkubationszeit: Schnitte vom Vibratom = 3-5 Stunden, Schnitte vom Kryostat = 2-3 Stunden, Raumtemperatur). Abschließend wurden die Schnitte 3 mal in 10-minütigen Schritten gewaschen (Umbettung in PB, Molarität 0,1), um dann auf einen Objektträger aufgezogen und mit einem Deckgläschen und ProLong Gold® (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland, Shandon Immu-Mount™ (Thermo Scientific, Pittsburgh, Pennsylvania, USA) oder Glycerolgelatine (Millipore Corporation (in Kooperation mit Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) fixiert werden zu können.

C.3.4.4 DAPI Färbung

Die Schnitte wurden in 12-Well-Platten (5 Schnitte je Well) gesammelt und mit DAPI-Lösung (Tabelle 6) für 1 Minute inkubiert. Es folgten 3-5 Waschschrte mit neu angesetztem PB (Molarität 0,1, je Waschschrte 5-10 Minuten). Abschließend wurden die Schnitte aufgezogen und mit ProLong Gold® (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland, Shandon Immu-Mount™ (Thermo Scientific, Pittsburgh, Pennsylvania, USA) oder Glycerolgelatine (Millipore Corporation (in Kooperation mit Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) fixiert.

C.3.4.5 Mikroskopie

Die Fluoreszenzanalysen der Schnitte wurden mit den Geräten Olympus BX 50, Olympus Ck2 (Olympus, Hamburg, Deutschland) und dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop SL (Leica TCS SL, Bensheim, Deutschland) durchgeführt.

Mit dem konfokalen Mikroskop von Leica war es möglich, Analysen der Schnitte vom Gehirn in den Wellenlängen 405 (DAPI), 488 (Argon, GFP) und 543 (Helium Neon Laser, DsRed) zeitgleich durchzuführen. So konnten mehrere Färbungen (siehe Abschnitt C.3.4.3) ausgewählter Zellbestandteile parallel beobachtet und ausgewertet werden. Die Bildauswertung er-

folgte mit der Software „Leica confocal software“ (Leica, Bensheim, Deutschland), MetaMorph® (Version 7.7.3, Molecular Devices, Sunnyvale, Kalifornien, USA) und mit ImageJ (Nationale Gesundheitsinstitute, Bethesda, Maryland, USA).

Das Olympus BX 50 und das Olympus Ck2 wurden für Übersichtsaufnahmen, Auszähl- und Kontrollstudien elektroporierter Bereiche genutzt. Mit Durchlichtaufnahmen des Olympus Ck2 konnten die Resultate der X-Gal-Färbungen ausgewertet werden.

C.3.4.5.1 Auswertungsschema zentralnervöser Transfektionsregionen

Es wurden 4 frontale Schnittebenen (SE) auf der rostrokaudalen Achse aus murinen, transfizierten Gehirnen von 18 Tage alten Embryonen (E18, *p.c.*) für die Analysen angefertigt (Abbildung 8 zeigt die Schnittebenen).

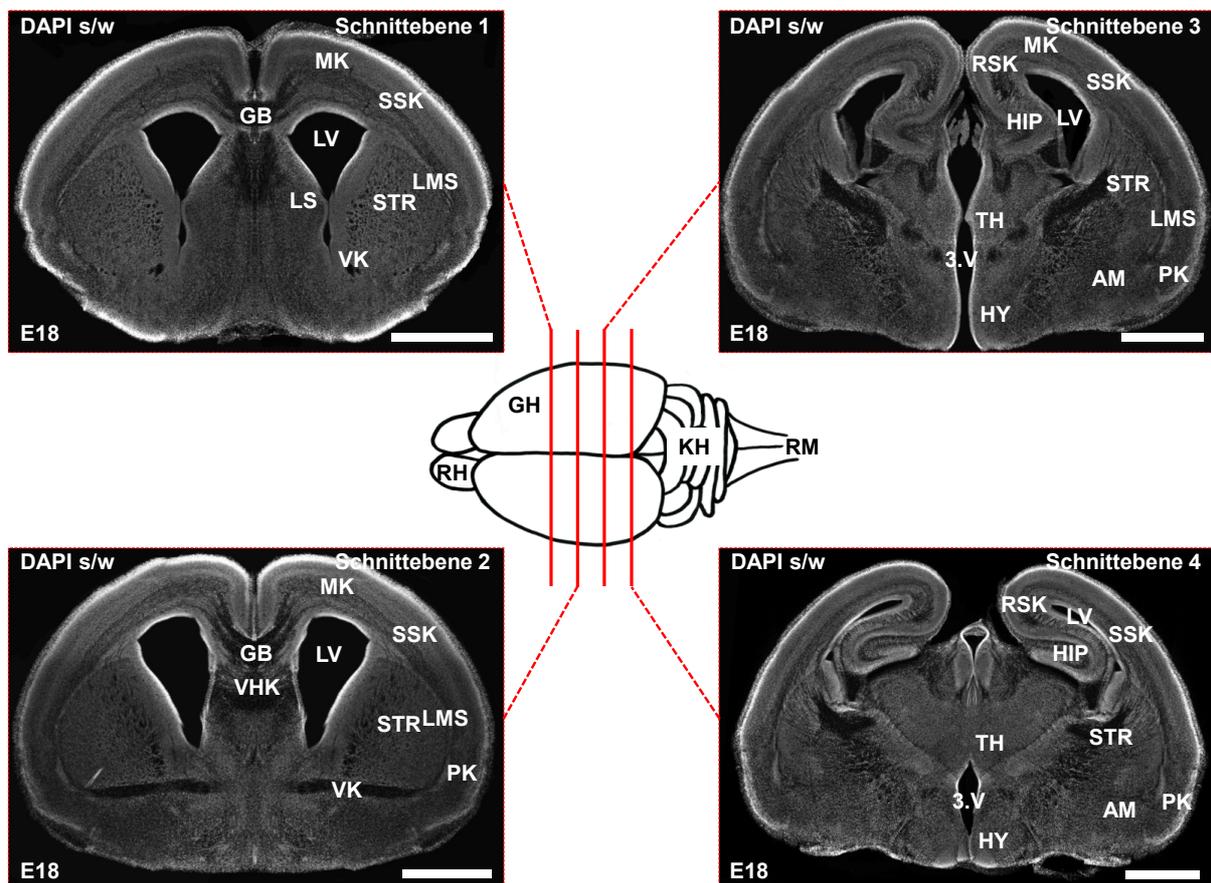


Abbildung 8: Übersicht der Schnittebenen (SE)

Die Grafik in der Mitte zeigt die Positionen der entnommenen 4 Schnittebenen. (3.V = 3. Ventrikel, AM = Amygdala, GB = Gehirnbalken (*Corpus callosum*), GH = Großhirn (*Telencephalon*), HIP = Hippocampus, HY = Hypothalamus, KH = Kleinhirn (*Cerebellum*), LMS = Lateraler migratorischer Strom, LS = Lateraler Septumkern, LV = Lateraler Ventrikel, MK = Motorischer Kortex, PK = Piriformer Kortex, RH = Riechhirn (*Bulbus olfactorius*), RM = Rückenmark (*Medulla spinalis*), RSK = Retrosplenialer Kortex, SSK = Somatosensorischer Kortex, STR = Striatum

(*Corpus striatum*), TH = Thalamus, VHK = Ventrale hippocampale Kommissur, VK = Vordere Kommissur (*Commissura anterior*), DAPI s/w (4',6-Diamidin-2-phenylindol) Aufnahme in Schwarz-weiß, Messbalken = 1 Millimeter)

Aus der kortikalen Großhirnanlage wurde der somatosensorische (SE 1-4), motorische (SE 1-3), retrospleniale (SE 3-4) und piriforme Kortex (SE 2-4) manipuliert (siehe Abschnitt D.1.4.1). Aus dem Bereich des Allokokortex waren die Hippocampusformation mit dem Ammonshorn (*Cornu ammonis*, CA) und der *Gyrus dentatus* (GD) im Fokus der Schnittebenen 3-4 zu analysieren (SE 3-4, siehe Abschnitt D.1.4.2). Kernbereiche, wie der laterale Septumkern (SE 1), das Striatum (SE 1-4), der Thalamus (SE 3-4) und der Hypothalamus (SE 3-4) wurden ebenfalls gezielt durch eine Transfektion in dieser Arbeit beeinflusst (siehe Abschnitt D.1.4.3). Außerdem wurden neuronale Projektionen, wie z. B. der Gehirnbalken (SE 1-2, *Corpus callosum*), die ventrale hippocampale Kommissur (SE 2), der laterale migratorische Strom (SE 1-3) und die vordere Kommissur (SE 1-2, *Commissura anterior*) durch die gebildeten fluoreszierenden Proteine in den Ausläufern transfizierter Zellen dargestellt (siehe Abschnitt D.1.4.4).

C.3.4.5.2 Histogrammanalyse und Zellkörperauszählung

Als Vorlage zur Auswertung somatosensorischer Transfektionen in Abhängigkeit von den transfizierten Embryonalstadien wurden 2 zu analysierende, frontale Schnittebenen festgelegt. Die durchzuführenden Analysen sollten einen qualitativen Durchschnitt des Transfektionserfolges darstellen können. Die erste Schnittebene wurde aus dem mittleren Bereich des embryonalen Großhirns an folgenden Strukturen erkannt und bestimmt:

- Gehirnbalken (*Corpus callosum*), vordere hippocampale Kommissur, vordere Kommissur (*Commissura anterior*) und piriformer Kortexbereich

Die 2., kaudal gelegene Schnittebene wurde an folgenden Strukturen festgelegt:

- Hippocampusformation, Amygdala, Thalamus- und Hypothalamuskern und deutlich erkennbarer 3. Ventrikel

Die angefertigten Schnitte waren 70 Mikrometer dick. Diese Dicke reichte aus, um die beiden Schnittebenen in allen transfizierten Gehirnen wiederzufinden (Abbildung 9). Zur Auswertung wurden nur Gehirne genommen, die in beiden Schnittebenen erkennbare GFP-positive Zellen hatten.

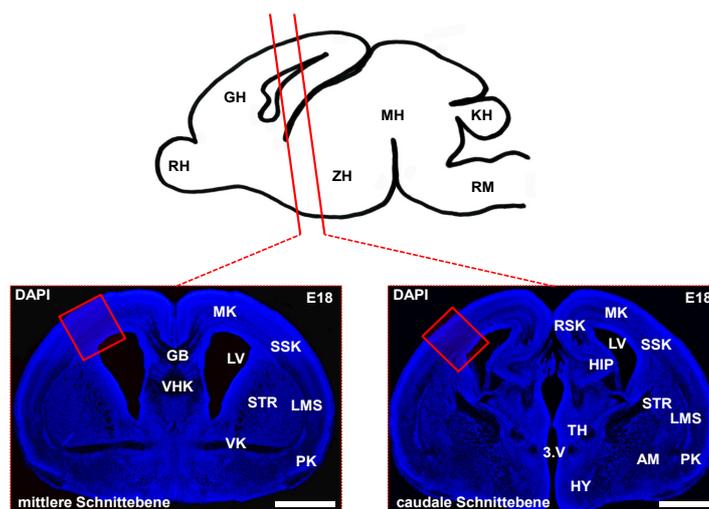


Abbildung 9: Darstellung analysierter Schnittebenen eines embryonalen, 18 Tage alten murinen Gehirns (E18, p.c.)

Für die Messung der neuronalen Migration wurden Bereiche (Rechteck) des somatosensorischen Kortex aus der mittleren und caudalen Schnittebene ausgewählt. (Grafik oben: Sagittalebene Mausehirn E18, 3.V = 3. Ventrikel, AM = Amygdala, GB = Gehirnbalken (*Corpus callosum*), GH = Großhirn (*Telencephalon*), HIP = Hippocampus, HY = Hypothalamus, KH = Kleinhirn (*Cerebellum*), LMS = Lateraler migratorischer Strom, LV = Lateraler Ventrikel, MH = Mittelhirn (*Mesencephalon*), MK = Motorischer Kortex, PK = Piriformer Kortex, RH = Riechhirn (*Bulbus olfactorius*), RM = Rückenmark (*Medulla spinalis*), RSK = Retrosplenialer Kortex, SSK = Somatosensorischer Kortex, STR = Striatum (*Corpus striatum*), TH = Thalamus, VHK = Ventrale Hippocampale Kommissur, VK = Vordere Kommissur (*Commissura anterior*), ZH = Zwischenhirn (*Diencephalon*), DAPI = 4',6-Diamidin-2-phe-nylindol, Messbalken = 1 Millimeter).

Nachdem die zu analysierenden Regionen im Großhirn bestimmt waren, wurde der Bereich des somatosensorischen Kortex zwischen Marginalzone und Intermediärzone in 10 gleiche Abschnitte eingeteilt. Mithilfe der fluoreszierenden Pigmente in den transfizierten, GFP-positiven Zellen konnten Histogramme mit MetaMorph® (Version 7.7.3, Molecular Devices, Sunnyvale, Kalifornien, USA) über alle Abschnitte hinweg erstellt werden. Die Messung erfolgte über Grauwerte, die die Fluoreszenzsignalstärke einzelner Pigmente darstellte.

Damit eine durchschnittliche Datenerhebung durchgeführt werden konnte, wurden Histogramme von 200 Mikrometer breiten transfizierten Bereichen erstellt. Aus diesen Daten wurden die Mittelwerte (Median) angegeben. Aus jeder Schnittebene wurden 2 dieser Mediane der Histogrammauswertungen erstellt. Die gemessenen Pixel dieser Mediane wurden auf die zuvor festgelegten 10 Abschnitte des Querschnittes der dorsolateralen Großhirnregion mit Excel (Microsoft Office® (Version 2010), Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) prozentual in ihrer Verteilung berechnet. Die Aufteilung der 10 Abschnitte begann mit Abschnitt 1 (Marginalzone) und mit den anschließenden Abschnitten 2-5, die die kortikale Platte beinhalteten. Die Intermediärzone war durch Abschnitt 6 und 7 präsentiert. Die subventrikuläre und die ventrikuläre Zone konnten in den Abschnitten 8-10 unterteilt werden (Abbildung 10).

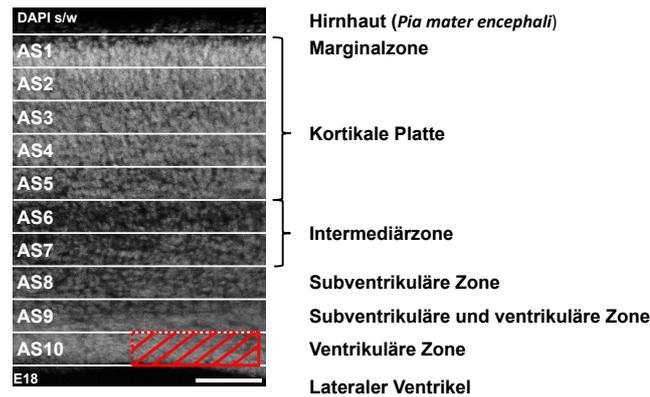


Abbildung 10: Aufteilung des somatosensorischen Kortexareals in 10 Abschnitte mit histologischer Schichtzusammensetzung

Zur quantitativen Erfassung der Fluoreszenzen, die transfizierte Zellen repräsentieren, wurden die einzelnen Abschnitte durch Histogrammanalysen und Zellauszählungen erfasst. Der rote Kasten stellt ein Beispiel für die Auszählung GFP-positiver Zellen im Abschnitt 10 dar. So wurden die Zellen, die im oberen und linken gestrichelten Rand mit mehr als der Hälfte des Zellkörpers im roten Feld detektiert werden konnten, in die Auszählung mit eingeschlossen (AS = Abschnitt, E = Embryonalstadium, DAPI s/w = 4',6-Diamidin-2-phenylindol-Aufnahme in Schwarz-weiß, Messbalken = 100 Mikrometer).

Die Berechnung der Histogramme wurde durch quantitative Zellkörperauszählungen überprüft. Damit eine Vergleichbarkeit zwischen der Histogrammberechnung und der Zellauszählung möglich war, wurden die gleichen Gewebeausschnitte jedes Embryos für beide Analyseverfahren gegenübergestellt. Für die Zellauszählung wurden die 200 Mikrometer breiten Bildausschnitte der Histogrammanalyse mit einem Raster, der 10 gleich große Felder zwischen Ventrikulär- und Marginalzone ausbildete, ausgewertet (Abbildung 10, AS1-AS10). Dabei wurden GFP-positive, detektierte Zellen aus dem oberen und linken Randbereich (Abbildung 10, rote gestrichelte Linie) in die Zählung des Gesamtfeldes (Abbildung 10, roter Kasten in AS10) mit eingeschlossen. Für die Zählung der Zellen aus dem Randbereich wurden nur die mit aufgeführt, die mehr als die Hälfte ihres Zellkörpers im auszuwertenden Einzelfeld hatten.

Die Ergebnisse der transfizierten Bereiche aus beiden Analyseverfahren (Histogrammberechnung und Zellauszählung) wurden für die Vergleichbarkeit ins prozentuale Verhältnis gesetzt. Durch die Vorgabe des Volumens (1,5 Mikroliter) und der Konzentration (4 Mikrogramm je Mikroliter) der injizierten Plasmide konnte der Transfektionserfolg in den Vorläuferzellen aller Embryonalstadien verhältnismäßig gleich bewertet werden. Aus diesem Grund wurde dieser Abschnitt 10 als Referenz für die statistische Auswertung der anderen 9 Abschnitte innerhalb des gleichen Analyseverfahrens verwendet. Für den Vergleich zwischen beiden Analyseverfahren (Histogrammanalyse und Zellauszählung) wurden die prozentualen Verteilungswerte innerhalb der einzelnen Abschnitte ausgewertet.

C.3.5 Zellbiologische Methoden

HEK293-Zellen wurden freundlicherweise von Mitarbeitern des Instituts für Mikroskopische Anatomie und Neurobiologie (Universitätsmedizin Mainz, Deutschland) aus deren Zellkulturen in 6-Well-Platten (ca. 5×10^5 Zellen/Well) zur Verfügung gestellt. Diese Zelllinie eignet sich für Einbringung von Plasmiden besonders gut, da sie einfach zu kultivieren und zu transfizieren ist (Baldi et al. 2005). So konnten nicht funktionelle Plasmide ausgeschlossen werden.

C.3.5.1 Lipid-vermittelte Transfektion

Für eine Transfektion von 5×10^5 Zellen wurde 0,75 Mikroliter der Plasmidpräparation (C.3.3.6, 4 Mikrogramm je Mikroliter) in 125 Mikroliter „Dulbecco’s Modified Eagle Medium“ (DMEM-Medium, Tabelle 6) vorgelegt.

In einem 2. Ansatz wurde der Lipofectamine™ 2000 Master-Mix durch die Zugabe von 5 Mikroliter Lipofectamine™ 2000 in 125 Mikroliter DMEM-Medium angesetzt. Beide Ansätze wurde im Verhältnis 1:1 (insgesamt 250 Mikroliter) vermischt und bei Raumtemperatur für 20 Minuten in einem 2,5-Milliliter-Tube inkubiert.

Vor der Transfektion wurden 750 Mikroliter mit 10-Prozent-FCS-supplementiertem DMEM zugegeben. Das bestehende Kulturmedium („Dulbecco’s Modified Eagle Medium“ mit 10 Prozent fetalem Kälberserum und 1 Prozent Penicillin/Streptomycin) wurde entfernt und 1 Milliliter des zuvor hergestellten Ansatzes zu den je 5×10^5 HEK293-Zellen je Well zugegeben.

Die Zellen wurden für 24 Stunden in einer 5-prozentigen CO₂-Atmosphäre mit einer 95-prozentigen Luftfeuchtigkeit und bei 37 Grad Celsius in einem Inkubator kultiviert. Am 1. Tag nach Transfektion wurde je Well 1 Milliliter DMEM, supplementiert mit fetalem Kälberserum (FCS, 10 Prozent) und Antibiotika (Penicillin/Streptomycin, 1 Prozent), hinzugegeben. Die Zellen wurden anschließend für weitere 24 Stunden im Inkubator kultiviert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Olympus, Hamburg, Deutschland, Tabelle 2) auf die durch die Plasmide eingebrachten Fluoreszenzsignale hin untersucht.

C.3.6 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung erfolgte mit PRISM® (Version 5.04, GraphPad Software, Inc., CA, USA) und dem Programm SPSS (Version 17 und 18 Zentrale Datenverarbeitungsstelle, Universitätsmedizin Mainz, Deutschland). Vor statistischen Analysen wurde die Normalverteilung der Ergebnisse mit dem Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Lag eine Normalverteilung vor, wurde für die Analyse von 2 Gruppen der Student's-t-Test, für mehrere Gruppen der ANOVA-Test (Post-hoc-Test: Bonferroni-Korrektur) durchgeführt. Bei nicht parametrischer Normalverteilung wurde die Statistik bei 2 Gruppen mit dem Mann-Whitney-Test, bei mehreren Gruppen mit dem Kruskal-Wallis-Test (Post-hoc-Test: Dunns-Korrektur) erhoben.

Nach Gewinnung der Mittelwerte wurden die dazugehörigen Standardfehler berechnet. Als signifikant wurde die Wahrscheinlichkeit ($p < 0,05$; 5 Prozent Signifikanzniveau) festgelegt. Diese gibt an, inwieweit der mittlere Wert einer Messreihe von einem angenommenen Wert abweicht (Signifikanz).

D Eigene Untersuchungen und Ergebnisse

D.1 Etablierung der *In-utero*-Elektroporationstechnik mit C57BL/6-Mäusen

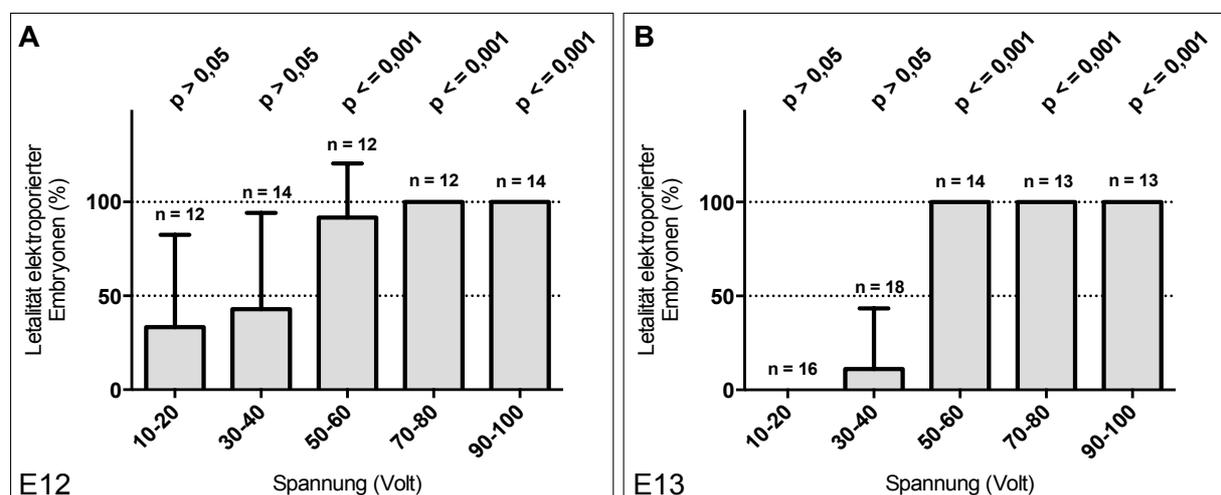
Für die hier beschriebene Etablierung des *In-vivo*-Modells einer Plasmidtransfektion wurden C57BL/6-Wildtypmausembryonen verwendet.

Im nachfolgend beschriebenen Versuchsaufbau wurden die einzelnen technischen und methodischen Bereiche der Transfektion von Mäusembryonen überprüft, um die Methodik und Auswertung zu optimieren.

D.1.1 Elektroporationseffizienz

Zur Generierung von Transfektionsprotokollen für C57BL/6-Mäusembryonen wurde zuerst der Zusammenhang zwischen der anzuwendenden Spannung während der Elektroporation im Verhältnis zum manipulierten Embryonalstadium (E) ermittelt.

Die Auswirkungen der unterschiedlichen Spannungen wurden bei 12-17 Tage alten Embryonen (*p.c.*) 2-4 Tage nach Elektroporation untersucht. 2-3 Embryonen pro tragende Maus wurden mit einer Spannung von 10-100 Volt (50 Millisekunden Spannungsgabe, 950 Millisekunden Intervallpause, 5 Intervalle) elektroporiert. Als Kontrolle wurden 3 tragende Mäuse je Embryonalstadium operiert, die Embryonen jedoch nicht elektroporiert. Für die Beurteilung der Belastungen wurde die prozentuale Letalität der elektroporierten Uterusfrüchte nach dem Eingriff ins Verhältnis zu nicht elektroporierten Embryonen der Kontrollen gesetzt (Abbildung 11, A-F, E12-E17, *p.c.*).



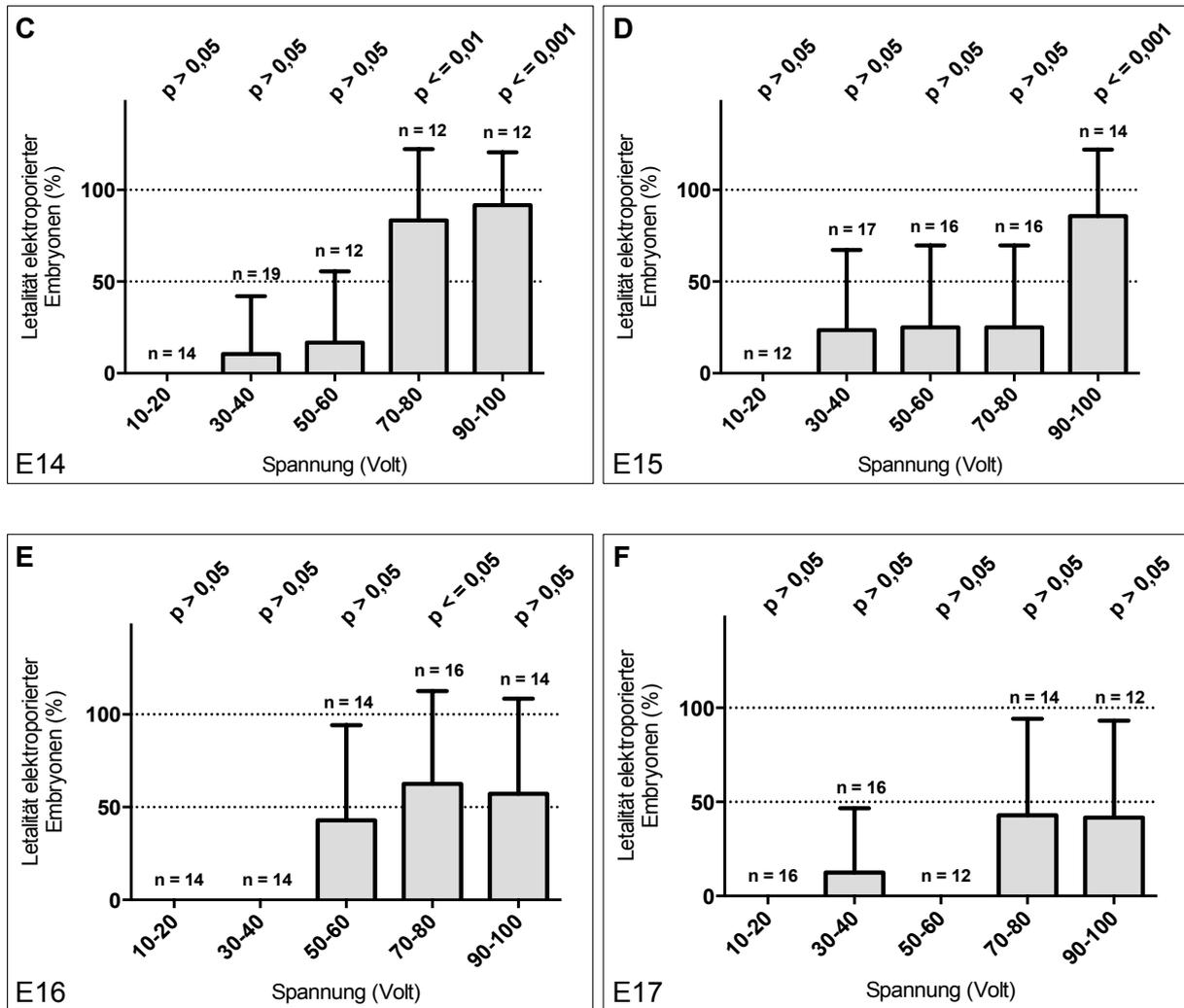


Abbildung 11: Die Abhängigkeit von der eingesetzten Spannung (Volt) während der Elektroporation in Bezug auf die Sterblichkeit (Letalität) der manipulierten Embryonalstadien (E)

12-17 Tage alte Embryonen (E, *post conceptionem*) wurden mit Spannungen zwischen 10 und 100 Volt elektroporiert. Die Letalität manipulierter Embryonen wurde mit nicht elektroporierten Kontrolltieren verglichen (Letalität nicht manipulierter Embryonen = 0 Prozent, Anzahl nicht manipulierter Embryonen (Kontrolle) = 6 Embryonen je Voltzahl; Kruskal-Wallis-Test, Post-hoc-Test Dunns-Korrektur, Mittelwert mit SD, n = Anzahl der elektroporierten Embryonen, p = Signifikanzwert).

Je weiter das Entwicklungsstadium der C57BL/6-Embryonen war, desto niedriger war die prozentuale Letalität. Dies zeigte sich vor allem bei höheren Spannungsgaben.

Embryonen im Alter von 12-13 Tagen (Abbildung 11 A und B, E12 und E13, *p.c.*) zeigten ab 50-60 Volt eine signifikant erhöhte Letalität im Vergleich zu den nicht elektroporierten Kontrollen (Kruskal-Wallis-Test, Post-hoc-Test Dunns-Korrektur, Anzahl Kontrolle n = 6 (E12) und n = 6 (E13), Anzahl elektroporierter Embryonen E12: 10-20 Volt n = 12, 30-40 Volt n = 14, 50-60 Volt n = 12, 70-80 Volt n = 12 und 90-100 Volt n = 14; Anzahl elektroporierter Embryonen E13: 10-20 Volt n = 16, 30-40 Volt n = 18, 50-60 Volt n = 14, 70-80 Volt n = 13 und 90-100 Volt n = 13).

Ab dem 14. Embryonalstadium (E14, *p.c.*) führten diese Voltzahlen zu keiner signifikant erhöhten Letalität. Hier wurde erst ab 70 Volt eine signifikant erhöhte Letalität zu den Kontrollen beobachtet (Abbildung 11 C, Kruskal-Wallis-Test, Post-hoc-Test Dunns-Korrektur, Anzahl Kontrolle $n = 6$, Anzahl elektroporierter Embryonen: 10-20 Volt $n = 14$, 30-40 Volt $n = 19$, 50-60 Volt $n = 12$, 70-80 Volt $n = 12$ und 90-100 Volt $n = 12$).

Eine geringere Letalität bei höheren Spannungen (ab 60 Volt) zeigte sich auch im späteren E15-Stadium (Abbildung 11 D, Kruskal-Wallis-Test, Post-hoc-Test Dunns-Korrektur, Anzahl Kontrolle $n = 6$, Anzahl elektroporierter Embryonen: 10-20 Volt $n = 12$, 30-40 Volt $n = 17$, 50-60 Volt $n = 16$, 70-80 Volt $n = 16$ und 90-100 Volt $n = 14$).

Elektroporationen bis 40 Volt an 16 Tage alten Embryonen beeinflusst nicht deren Sterblichkeit durch die Manipulation. Die Letalität in höheren Spannungsabgaben schwankte im Mittelwert bei 50 Prozent und zeigte bei 70-80 Volt eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 11 E, Kruskal-Wallis-Test, Post-hoc-Test Dunns-Korrektur, Anzahl Kontrolle $n = 6$, Anzahl elektroporierter Embryonen: 10-20 Volt $n = 14$, 30-40 Volt $n = 14$, 50-60 Volt $n = 14$, 70-80 Volt $n = 16$ und 90-100 Volt $n = 14$).

Eine Elektroporation im letzten Abschnitt der Trächtigkeit einer Maus (E17, *p.c.*) erbrachte einen Elektroporationserfolg von mehr als 50 Prozent bei allen vorgegebenen Spannungen (Abbildung 11 F, Kruskal-Wallis-Test, Post-hoc-Test Dunns-Korrektur, Anzahl Kontrolle $n = 6$, Anzahl elektroporierter Embryonen: 10-20 Volt $n = 16$, 30-40 Volt $n = 16$, 50-60 Volt $n = 12$, 70-80 Volt $n = 14$ und 90-100 Volt $n = 12$).

Um zu erfahren, ob nicht manipulierte Uterusfrüchte, die sich in Nachbarschaft zu den elektroporierten Embryonen befanden, nach den Spannungsabgaben ebenfalls belastet waren, wurde zusätzlich deren Letalität untersucht. Dazu wurde die Letalität der elektroporierten Embryonen (n_e) zu den nicht elektroporierten Embryonen (n_{ne}) abgebildet (Abbildung 12).

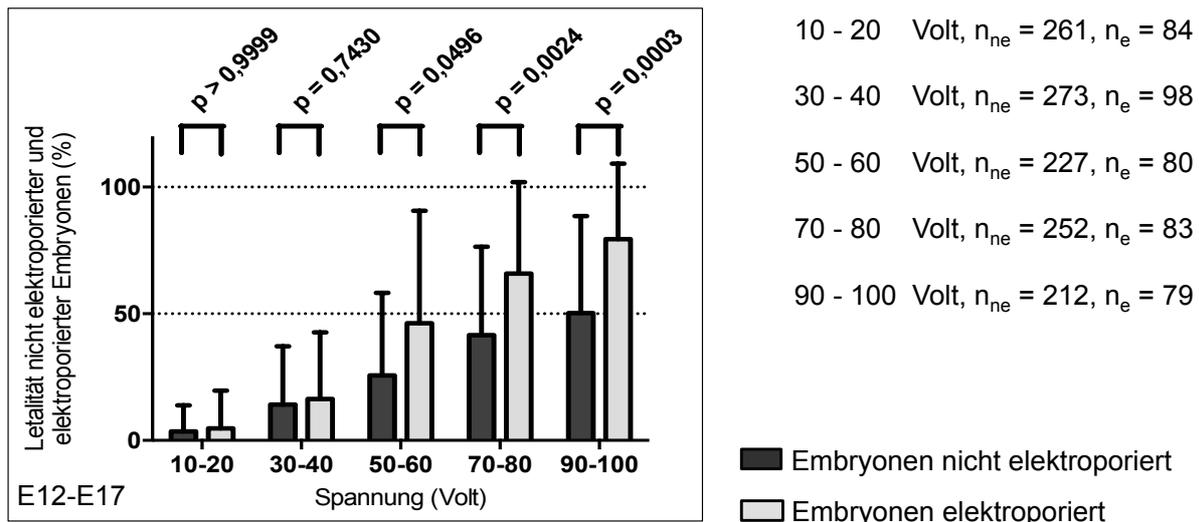


Abbildung 12: Letalität elektroporierter und nicht elektroporierter Embryonen

Gezeigt sind alle manipulierten Embryonalstadien (E12-E17) in Bezug zur eingesetzten Spannung (Volt). Mit zunehmender Größe der Spannung steigt die Wahrscheinlichkeit der Sterblichkeit (Letalität) aller Embryonen. Nach Spannungsabgaben von mehr als 50 Volt während der Elektroporation gab es signifikante Unterschiede zwischen elektroporierten und nicht elektroporierten Embryonen (Mann-Whitney-Test, Mittelwert mit SD, n_{ne} = Anzahl der nicht elektroporierten Embryonen, n_e = Anzahl der elektroporierten Embryonen, V = Volt, p = Signifikanzwert).

Mit einer zunehmenden Spannungsgabe stieg die Letalität der elektroporierten und nicht elektroporierten Embryonen.

In Spannungsabgaben bis 40 Volt konnte kein signifikanter Unterschied in der Letalität zwischen nicht elektroporierten und elektroporierten Embryonen festgestellt werden. Ab 50 Volt war die Letalität der nicht elektroporierten Embryonen signifikant geringer als die der elektroporierten Uterusfrüchte (Mann-Whitney-Test, Mittelwert mit SD, n_{ne} = Anzahl der nicht elektroporierten Embryonen: 10-20 Volt $n_{ne} = 261$, 30-40 Volt $n_{ne} = 273$, 50-60 Volt $n_{ne} = 227$, 70-80 Volt $n_{ne} = 252$ und 90-100 Volt $n_{ne} = 212$; n_e = Anzahl der elektroporierten Embryonen: 10-20 Volt $n_e = 84$, 30-40 Volt $n_e = 98$, 50-60 Volt $n_e = 80$, 70-80 Volt $n_e = 83$ und 90-100 Volt $n_e = 79$).

Bei einer Steigerung über 40 Volt kam es bei allen Embryonalstadien verstärkt zu negativen Auswirkungen auf das Wohlbefinden der tragenden Weibchen. Dies zeigte sich durch apathisches Auftreten, vernachlässigte Fellpflege und gehäuften Totalabort in der postoperativen Zeit. Der Totalabort wurde in der statistischen Berechnung der Letalität in Abbildung 11 prozentual mit einbezogen. Aus tierschutzrechtlichen Gründen wurde für weiterführende Versuche eine maximale Spannungsabgabe von 40 Volt festgesetzt.

D.1.2 Plasmidtransfektionen

Für die Plasmidtransfektionen wurden Plasmide verwendet, die entweder das codierte grün fluoreszierende Protein (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* oder das rot fluoreszierende Protein aus der Scheibenanemone *Discosoma sp.* (DsRed) in erfolgreich transfizierten Zellen bildeten. Die manipulierten Zellen konnten durch diese Fluoreszenz markiert und histologisch aufgearbeitet werden.

D.1.2.1 Plasmidtransfektion *in vitro* (HEK293-Zellen)

Plasmide, die für spätere *In-utero*-Elektroporationen verwendet werden sollten, wurden, um unnötige Tierversuche zu vermeiden, zuerst in der HEK293-Zelllinie („Human Embryonic Kidney“) getestet.

Es wurden die Plasmide *pCAG-DsRed2*, *pCAGIG* (beide Addgene, Cambridge, Großbritannien), *pCAG-EGFP* (AG Parnavelas, UCL, London, Großbritannien), *pCLEG* und *pCAGGS* (beide AG Sestan, Yale University, New Haven, USA) durch lipid-vermittelte Plasmid-DNS-Transfektion in die Zellen eingebracht. Bei einer erfolgreichen Transfektion wurde in den HEK293-Zellen das fluoreszierende Protein, das in den Plasmiden codiert war, gebildet. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Abbildung 13).

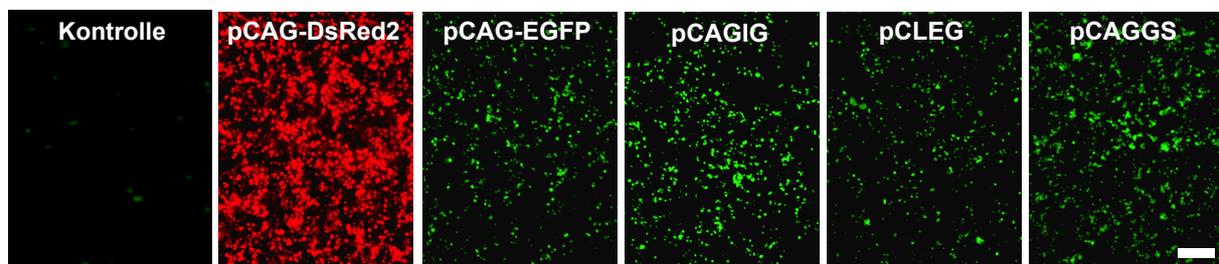


Abbildung 13: Fluoreszenzaufnahmen von HEK293-Zellen nach lipid-vermittelter Transfektion

Eine erfolgreiche Transfektion der Plasmide *in vitro* konnte anhand deutlicher Expressionen der Fluoreszenzproteine gegenüber der Kontrolle erkannt werden (Aufnahmen 2 Tage nach Transfektion, Messbalken = 250 Mikrometer).

Für die statistische Übersicht wurden die transfizierten HEK293-Zellkulturen gezählt. Hierfür wurden die transfizierten Zellen in Zellkulturplatten kultiviert und 2 Tage nach lipid-vermittelter Transfektion gezählt. Der prozentuale Anteil der fluoreszierenden HEK-293-Zellen (positiv transfiziert) wurde aus der Auszählung von insgesamt 500 Zellen je Gesichtsfeld (Gesichtsfeld ca. 690 Mikrometer x 600 Mikrometer) bestimmt. Für die statistische Signifikanzberechnung wurde die prozentuale Anzahl der transfizierten Zellen mit denen von nicht transfizierten HEK293-Zellkulturen (Kontrolle, Abbildung 13) verglichen (Abbildung 14).

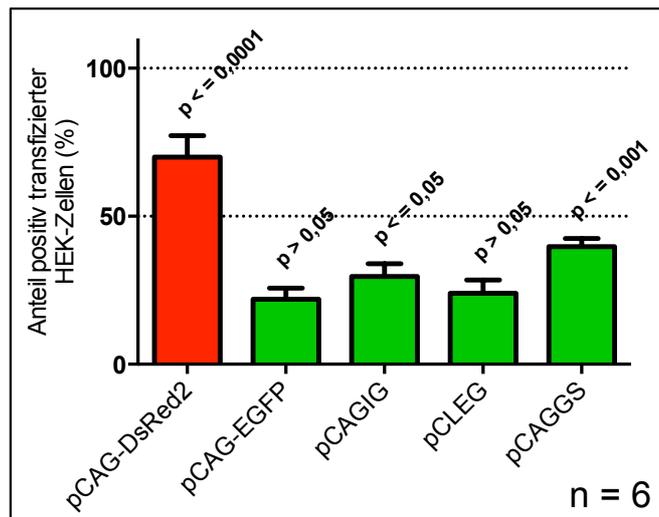


Abbildung 14: Statistische Auswertung der lipid-vermittelten Transfektion der Plasmide *pCAG-DsRed2*, *pCAG-EGFP*, *pCAGIG*, *pCLEG* und *pCAGGS* in HEK293-Zellen

Nach Transfektion der Plasmide *pCAG-DsRed2*, *pCAGIG* und *pCAGGS* gab es einen signifikanten Unterschied in der erhöhten Anzahl fluoreszierender HEK293-Zellen (Kontrolle = nicht transfizierte Zellkulturen, Kruskal-Wallis-Test, Post-hoc-Test Dunns-Korrektur, Mittelwert mit SD, n = Anzahl Gesichtsfelder je Plasmid, p = Signifikanzwert)

Es zeigte sich, dass die Plasmide *pCAG-DsRed2*, *pCAG-EGFP*, *pCAGIG*, *pCLEG* und *pCAGGS* erfolgreich in HEK293-Zellen transfiziert werden konnten.

Die Plasmide *pCAG-DsRed2*, *pCAGIG* und *pCAGGS* waren in der erhöhten Anzahl der transfizierten Zellen (Abbildung 14) deutlicher von den Plasmiden *pCAG-EGFP* und *pCLEG* zu unterscheiden (Kruskal-Wallis-Test, Post-hoc-Test Dunns-Korrektur, n = 6 untersuchte Gesichtsfelder je Plasmid).

Für die nachfolgenden *In-vivo*-Transfektionen in Mäuseembryonen wurden hauptsächlich die 3 erfolgreichsten *in vitro* getesteten Plasmide (*pCAG-DsRed2*, *pCAGIG* und *pCAGGS*) verwendet. Die Plasmide *pCAG-EGFP* und *pCLEG* wurden unter Vorbehalt (siehe Abschnitt D.1.2.3 und D.1.2.9.A) *in vivo* verwendet.

D.1.2.2 Plasmidtransfektion *in vivo* (C57BL/6-Maus)

Für die ersten Transfektionen von Plasmiden *in vivo* wurden Mäuseembryonen im Alter von 14 Tagen (E14, *p.c.*) verwendet. Das Ziel war es, neuronale Vorläuferzellschichten der subventrikulären Zone und des Hippocampus zu transfizieren. Diese Zellen befinden sich in der Nähe der lateralen Ventrikelwand. Um eine erfolgreiche Transfektion in Vorläuferzellen durchzuführen, mussten deshalb die Plasmide (*pCAGGS* und *pCAG-DsRed2*) unmittelbar in diesen Bereichen injiziert werden. Das Lumen des lateralen Ventrikelsystems eignete sich dafür besonders gut, da der Organismus das hier hinzugefügte Plasmidinjektionsvolumen

von 1-2 Mikroliter gut kompensieren kann. Die anschließende Elektroporation erfolgte mit 30-40 Volt. Der Pluspol der Elektrode wurde so an der Kopfanlage des Embryos ausgerichtet, dass die negativ geladene DNS der Plasmide in Richtung der sich entwickelnden kortikalen Schichten des Großhirns geleitet werden konnte. 4 Tage nach Transfektion wurden die manipulierten Embryonen (E18, *p.c.*) getötet und die präparierte Großhirnanlagen mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie analysiert (Abbildung 15)

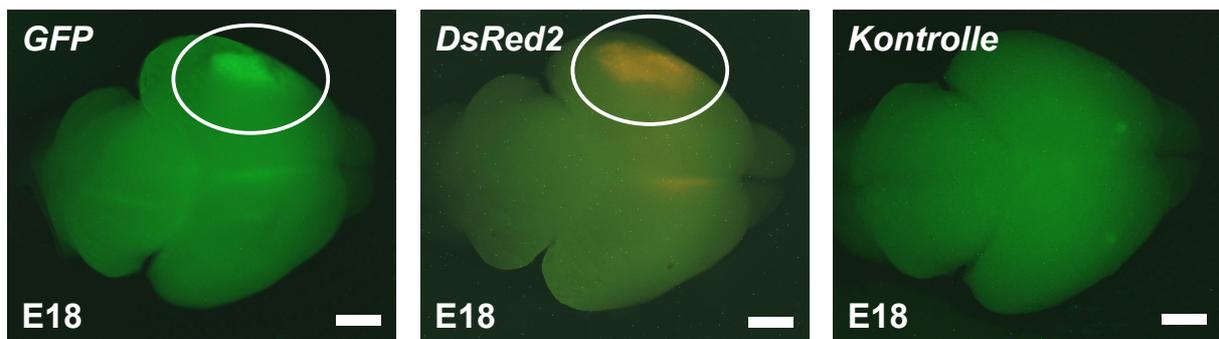


Abbildung 15: Erfolgreiche Transfektion durch Nachweis der Bildung von Fluoreszenzproteinen

Deutlich waren die Fluoreszenzen von GFP (linkes Bild, weiße Ellipse) und DsRed2 (mittleres Bild, weiße Ellipse) in den Großhirnhemisphären mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie nach erfolgreicher Transfektion zu erkennen. Das rechte Bild zeigt eine Kontrolle eines nicht transfizierten embryonalen Gehirns (E = Embryonalstadium, Messbalken = 1 Millimeter).

Nach einer erfolgreichen *In-utero*-Elektroporation der Vorläuferzellschicht der subventrikulären Zone konnte die Bildung der fluoreszierenden Proteine, die in den transfizierten Plasmiden codiert waren, nachgewiesen werden. Die manipulierten Großhirnanlagen zeigten deutliche grüne (GFP, Abbildung 15, Bild links) oder rote (DsRed2, Abbildung 15, Bild Mitte) Fluoreszenzen und waren auf dieser Art und Weise von nicht transfizierten Gehirnen (Kontrolle, Abbildung 15, Bild rechts) gut zu unterscheiden.

D.1.2.3 Fluoreszenzsignalstärke transfizierter Plasmide *in vivo*

Die *In-vitro*-Transfektionen (Abschnitt D.1.2.1) mit den Plasmiden *pCAG-EGFP* und *pCLEG* ergaben im Vergleich zu den Plasmiden *pCAG-DsRed2*, *pCAGIG* und *pCAGGS* schwächere Fluoreszenzsignale. Obwohl die Transfektion von allen Plasmiden *in vitro* erfolgreich war, sollte mit dieser Untersuchung nach möglichen Defiziten in der Fluoreszenzstärke *in vivo* gesucht werden. Damit sollten nicht vorhandene oder sehr schwache Fluoreszenzen der gebildeten Proteine als mögliche Fehlerquelle in zukünftigen Transfektionsversuchen ausgeschlossen werden.

Um eine quantitativ darstellbare Analyse durchführen zu können, wurden Embryonen im Alter von 14 Tage (E14, *p.c.*) mit einem der 5 Plasmide der *In-vitro*-Versuche (*pCAG-Ds-*

Red2, *pCAG-EGFP*, *pCAGIG*, *pCLEG* und *pCAGGS*) in einer Großhirnhemisphäre transfiziert. Die Präparation der Embryonen wurde 4 Tage nach Transfektion (E18, *p.c.*) durchgeführt. Für die Auswertung wurde die Anzahl der transfizierten Großhirnhemisphären, die unter ultraviolettem Licht ein erkennbares positives Fluoreszenzsignal hatten, bestimmt. Berechnet wurde der prozentuale Anteil der GFP-positiven Signale, der erfolgreich transfizierten Embryonen im Verhältnis zu nicht transfizierten Tieren (Abbildung 16).

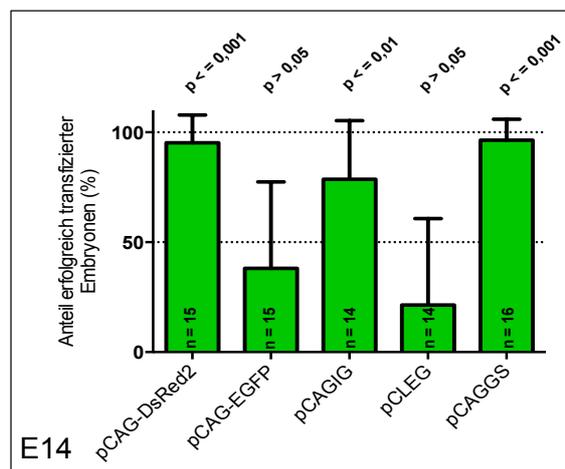


Abbildung 16: Variierende Transfektionserfolge der Plasmide (*pCAG-DsRed2*, *pCAG-EGFP*, *pCAGIG*, *pCLEG* und *pCAGGS*) in manipulierten Großhirnbereichen nach Transfektion

Transfektionen mit den Plasmiden *pCAG-DsRed2*, *pCAGIG* und *pCAGGS* zeigten einen signifikant höheren Anteil an erfolgreichen Transfektionen im Vergleich zu den Plasmiden *pCAG-EGFP* und *pCLEG* im Verhältnis zu nicht transfizierten Embryonen *in vivo* (Fluoreszenzstärke nicht transfizierter Embryonen (Kontrolle) = 0 Prozent, Kruskal-Wallis-Test, Post-hoc-Test Dunns-Korrektur, Mittelwert mit SD, E = Embryonalstadium bei Transfektion, p = Signifikanzwert, *pCAG-DsRed2* n = 15 Embryonen, *pCAG-EGFP* n = 15 Embryonen, *pCAGIG* n = 14 Embryonen, *pCLEG* n = 14 Embryonen, *pCAGGS* n = 16 Embryonen, Kontrolle n = 7 Embryonen)

Während die gebildeten Fluoreszenzproteine der Plasmide *pCAG-EGFP* und *pCLEG* nur schwache Signalstärken *in vivo* hatten, konnten bei den Plasmiden *pCAG-DsRed2*, *pCAGIG* und *pCAGGS* fast 100 Prozent aller transfizierten Embryonen durch positive GFP-Signale selektiert werden (Abbildung 16, Kruskal-Wallis-Test, Post-hoc-Test Dunns-Korrektur, *pCAG-DsRed2* n = 15 Embryonen, *pCAG-EGFP* n = 15 Embryonen, *pCAGIG* n = 14 Embryonen, *pCLEG* n = 14 Embryonen, *pCAGGS* n = 16 Embryonen, Kontrolle n = 7 Embryonen).

D.1.2.4 Expressionsbeginn fluoreszierender Proteine *in vivo*

Im Folgenden sollte der Beginn der Expression der Proteine, die durch die Transfektion in die manipulierten Zellen *in vivo* eingebracht wurden, untersucht werden.

Dazu wurden terminiert verpaarte C57BL/6-Mäuse am 14. Trächtigkeitstag (E14, *p.c.*) operiert und ihre Embryonen mit einem GFP-codierenden Plasmid (*pCAGIG*) in die kortikale

subventrikuläre Vorläuferzellschicht transfiziert. Die Embryonen wurden wenige Stunden nach Manipulation präpariert und analysiert. Die Bewertung der präparierten Gehirne erfolgte nach 3 Kriterien: 0 = kein Signal, 1 = schwaches Signal (Fluoreszenz nur in histologischen Schnittbildern durch Fluoreszenzmikroskopie nachweisbar) und 2 = deutliches Signal (Fluoreszenz makroskopisch am präparierten Großhirn unter ultraviolettem Licht nachweisbar). Die ausgewerteten Fluoreszenzen wurden prozentual im Vergleich zur nicht vorhandenen Expression zum Zeitpunkt 0 (Injektion der Plasmide) berechnet (Abbildung 17).

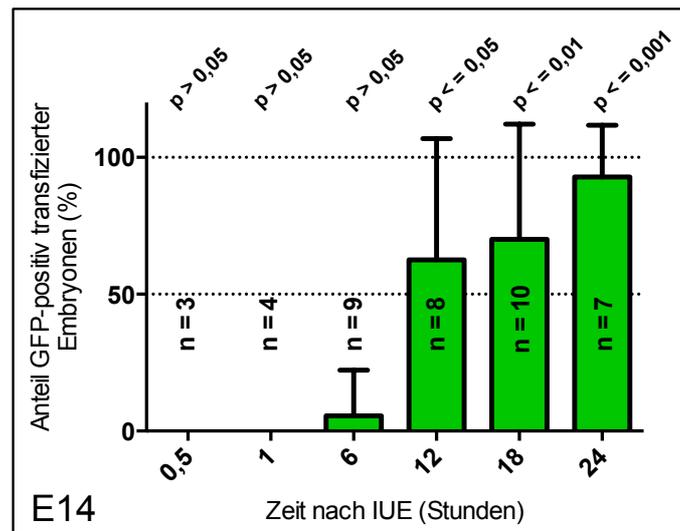


Abbildung 17: Bereits kurz nach der Plasmidtransfektion konnte die Expression von GFP nachgewiesen werden

Dargestellt wurde der prozentuale Anteil transifizierter Großhirnanlagen in Abhängigkeit von der Transfektionsdauer (Zeit nach IUE). Nach 24 Stunden waren in fast 100 Prozent aller transifizierten Gehirne fluoreszierende Proteine detektierbar (GFP-Signale zum Zeitpunkt 0 (Kontrolle) = 0 Prozent, Kruskal-Wallis-Test, Post-hoc-Test Dunns-Korrektur, Mittelwert mit SD, E = Embryonalstadium bei Transfektion, n = Anzahl transifizierter Embryonen, h = Stunden, p = Signifikanzwert).

Die ersten positiven Signale der transfizierten, fluoreszierenden Proteine (GFP) konnten mithilfe fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen 6 Stunden nach Transfektion in Gewebeschnitten nachgewiesen werden. Ein signifikanter Anstieg war nach weiteren 6 Stunden erkennbar. 24 Stunden nach Transfektion konnten makroskopisch bei fast 100 Prozent aller manipulierten Embryonen fluoreszierende Proteine im präparierten Großhirn unter ultraviolettem Licht (UV) nachgewiesen werden (Abbildung 17, Kruskal-Wallis Test, Post-hoc-Test Dunns-Korrektur, Anzahl transifizierter Embryonen: n = 3 bei 0 Stunden (Kontrolle), n = 3 bei 0,5 Stunden, n = 4 bei 1 Stunden, n = 9 bei 6 Stunden, n = 8 bei 12 Stunden, n = 10 bei 18 Stunden und n = 7 bei 24 Stunden nach Transfektion).

D.1.2.5 Expressionsverlauf fluoreszierender Proteine *in vivo*

Nachdem qualitativ ermittelt wurde, dass wenige Stunden nach der Transfektion die codierten Proteine bereits nachzuweisen waren (Abschnitt D.1.2.3), sollte mit dieser Studie der weitere Verlauf der Proteinexpression in den Zellen in Abhängigkeit von der Zeit zwischen Operation und Analyse (Transfektionsdauer) untersucht werden. Durch die Erhebung des quantitativen Anteils GFP-positiver Zellen in Abhängigkeit von der Transfektionsdauer konnte untersucht werden, ob die transfizierten Plasmide in der Mitose von den Vorläuferzellen an die Tochterzellen weitergegeben wurden.

Für diese quantitative Analyse des Expressionsverlaufs nach der *In-utero*-Elektroporation wurden positiv transfizierte Schnitte des somatosensorischen Kortexbereiches des Großhirns analysiert. Dazu wurden Embryonen im 12.-17. Trächtigkeitstag (E12-E17, *p.c.*) mit einem GFP-codierenden Plasmid (*pCAG/G*) in der kortikalen subventrikulären Vorläuferzellschicht transfiziert. Die manipulierten Gehirne wurden im Abschluss der Embryonalphase (E18, *p.c.*) präpariert. Somit betrug die Transfektionsdauer zwischen 1 (Abbildung 18 A, 1 Tag, IUE bei E17, *p.c.*) bis 6 Tage (Abbildung 18 B, 6 Tage, IUE bei E12, *p.c.*). Es wurde der prozentuale Anteil der grün fluoreszierenden Zellen (GFP-positiv) aus 1000 Zellen (DAPI-positiv) des kortikalen Bereichs zwischen Intermediärzone und Marginalzone ausgewertet. Für den statistischen Vergleich wurden diese prozentualen Verhältnisse GFP-positiver Zellen mit den Werten transfizierter Schnitte zum Zeitpunkt 0 (Injektion der Plasmide = Kontrolle) berechnet (Abbildung 18 C).

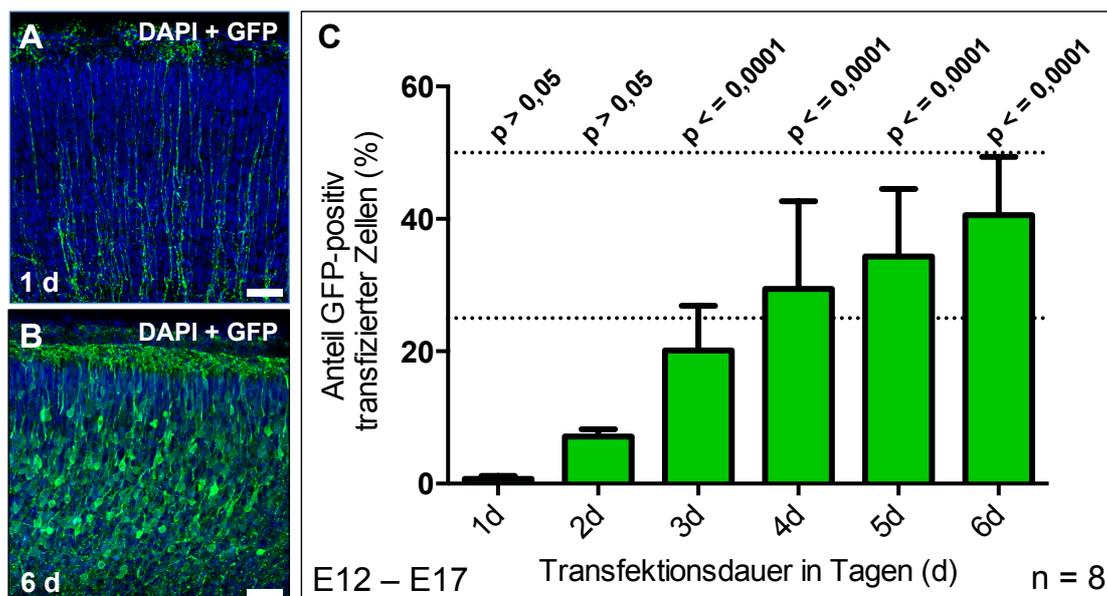


Abbildung 18: Prozentuale Häufigkeit von GFP-positiven Neuronen in Abhängigkeit von der Transfektionsdauer

Beispielbilder von Kortexbereichen des Großhirns, die (A) 1 Tag und (B) 6 Tage nach Transfektion aufgenommen wurden (Messbalken = 50 Mikrometer). (C) zeigt die steigende prozentuale Anzahl GFP-positiver Zellen mit län-

gerer Transfektionsdauer (GFP-positive Zellen zum Zeitpunkt 0 (Kontrolle) = 0 Prozent, 1way ANOVA, Post-hoc-Test Bonferroni-Korrektur, Mittelwert mit SD, E = Embryonalstadium bei Transfektion, n = Anzahl der gezählten Schnittbilder/transfizierte Embryonen je Zeiteinheit, d = Tag, p = Signifikanzwert)

24 Stunden nach Transfektion konnte nur knapp 1 Prozent GFP-positive Neurone detektiert werden. Mit zunehmender Transfektionsdauer wurde der prozentuale Anteil der GFP-positiven Neurone in den kortikalen Bereichen der Großhirnhemisphäre signifikant größer. 6 Tage nach der Transfektion war der prozentuale Anteil GFP-positiver Zellen auf das 40-fache angestiegen (Abbildung 18 B, 1way ANOVA, Post-hoc-Test Bonferroni-Korrektur, Kontrolle: n = 8, Anzahl der ausgewerteten Schnittbilder/transfizierte Embryonen: n = 8).

D.1.2.6 Einfluss der Plasmidtransfektion *in vivo* (C57BL/6-Maus)

Unter Abschnitt D.1.1 konnte gezeigt werden, dass alleinige Spannungsabgaben (Elektroporation) Einflüsse auf das Überleben von Embryonen hatten. Die zusätzliche Plasmidinjektion stellte eine weitere potenzielle Belastung dar. Dieser mögliche Effekt sollte in der folgenden Studie untersucht werden.

Für diesen Versuch wurden 14-17 Tage alte Embryonen (E14-E17, *p.c.*) mit einem GFP-co-dierenden Plasmid (*pCAGGS*) transfiziert. 2-4 Tage nach der *In-utero*-Elektroporation wurden die Embryonen präpariert. Zur Bestimmung des Einflusses einer Plasmidtransfektion *in vivo* wurde die prozentuale Sterblichkeit (Letalität) zwischen nicht elektroporierten, nicht injizierten und elektroporierten, injizierten (transfizierten) Embryonen vor und nach Eingriff ins Verhältnis gesetzt (Abbildung 19 A).

Um mögliche Auswirkungen auch bei nicht manipulierten Embryonen im gleichen Uterus zu erkennen, wurden die unbehandelten Uterusfrüchte ebenfalls analysiert. Ihre prozentuale Letalität wurde mit nicht manipulierten Embryonen aus der Elektroporationsstudie (Abschnitt D.1.1) verglichen (Abbildung 19 B).

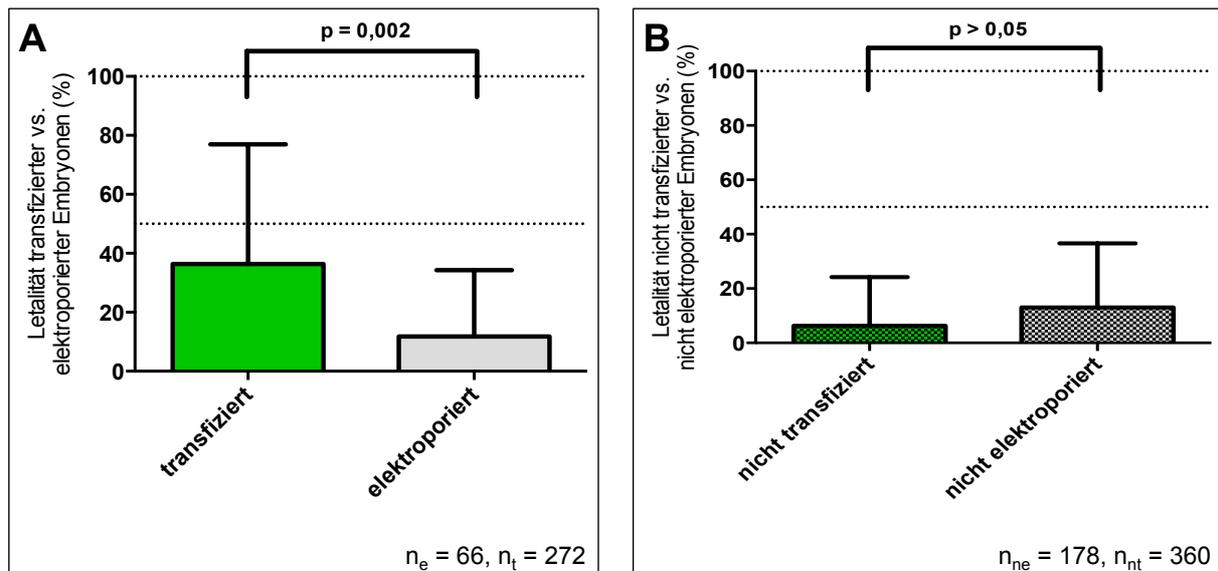


Abbildung 19: Einfluss der Transfektion auf die Letalität der Embryonen

(A) Plasmidinjektionen mit anschließender Elektroporation (= transfiziert) hatten einen signifikant höheren Einfluss auf die Letalität der Embryonen im Vergleich zu einfach durchgeführten Elektroporationen (= elektroporiert). Grafik (B) zeigt die prozentuale Letalität der nicht transfizierten und nicht elektroporierten Embryonen aus derselben manipulierten Maus aus Grafik (A). Es konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich ihrer Letalität gemessen werden (Mann-Whitney-Test, Mittelwert mit SD, n_{ne} = Anzahl der nicht elektroporierten Embryonen, n_e = Anzahl der elektroporierten Embryonen, n_{nt} = Anzahl der nicht transfizierten Embryonen, n_t = Anzahl der transfizierten Embryonen, p = Signifikanzwert).

Eine zusätzliche Injektion von Plasmiden hatte einen signifikant negativen Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der manipulierten Embryonen. Im Durchschnitt lag die Letalität prozentual doppelt so hoch wie bei den elektroporierten Embryonen, die keine Injektion erhielten (Abbildung 19 A, Mann-Whitney-Test, p = 0,002, Anzahl der elektroporierten Embryonen: n_e = 66, Anzahl der transfizierten Embryonen: n_t = 272).

Die im gleichen Uterus befindlichen, nicht manipulierten Embryonen zeigten unabhängig der Behandlung durch eine Transfektion oder einer einfachen Elektroporation keinen Unterschied in ihrer Letalität (Abbildung 19 B, Mann-Whitney-Test, p > 0,05, Anzahl der nicht elektroporierten Embryonen: n_{ne} = 178, Anzahl der nicht transfizierten Embryonen: n_{nt} = 360).

D.1.2.7 Spannungsabhängige Plasmidtransfektion *in vivo* (C57BL/6-Maus)

Mit den nachfolgenden Experimenten sollte das Spannungsfeld für eine optimale *In-utero*-Elektroporation mit der höchsten Ausbeute an positiv transfizierten Embryonen bestimmt werden. Die unter Abschnitt D.1.1 an der Großhirnanlage etablierte maximale Spannung von 40 Volt diente als obere Grenze. In der Versuchsreihe Abschnitt D.1.2.3 hatten einige Embryonen, die mit niedriger Spannung (≤ 30 Volt) transfiziert wurden, kein erkennbares Fluo-

reszenzsignal (= negativ transfiziert). Aus diesem Grund wurde die untere Spannungsgrenze auf 30 Volt festgesetzt.

Es wurden für diesen Versuch 12-17 Tage alte Embryonen (E12-E17, *p.c.*) manipuliert und ihre Lage im Uterushorn dokumentiert. Nach Injektion von GFP-codierenden Plasmiden (*pCAGIG* oder *pCAGGS*) wurden Elektroporationsspannungen von 30 bis 40 Volt an unterschiedlichen Embryonen angewendet. 2-4 Tage nach der *In-utero*-Elektroporation (E16-E19, *p.c.*) wurde der prozentuale Anteil der transfizierten (GFP-positives Signal) im Verhältnis zu den negativ transfizierten Embryonen (kein GFP-Signal) analysiert (Abbildung 20).

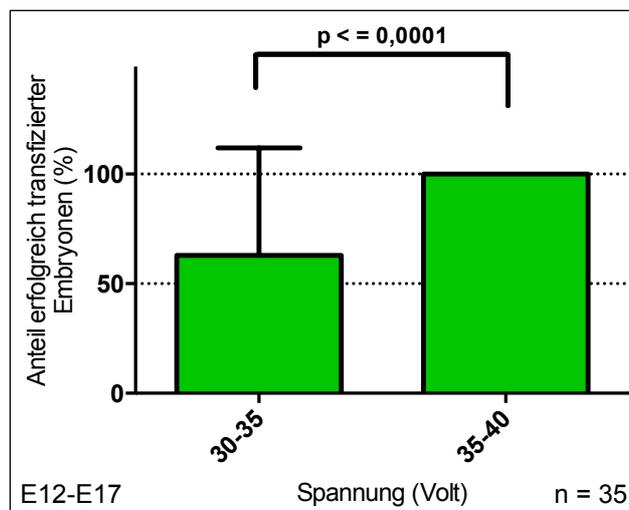


Abbildung 20: Der prozentuale Anteil erfolgreicher Transfektionen in Abhängigkeit von der angesetzten Spannung

Spannungsgaben von 35 bis 40 Volt hatten einen signifikant höheren Erfolg bei einer Transfektion im Vergleich zu den Versuchen mit 30-35 Volt (Mann-Whitney-Test, Mittelwert mit SD, n = Anzahl transfizierter Embryonen je Spannungswert, p = Signifikanzwert, E = Embryonalstadium bei Transfektion).

Es wurde ein signifikanter Unterschied in der Effizienz der Transfektion in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Spannungsabgaben festgestellt (Abbildung 20, Mann-Whitney-Test, Anzahl transfizierter Embryonen: 30-35 Volt n = 35 und 35-40 Volt n = 35). Während eine hundertprozentige Erfolgsquote von Transfektionen bei Spannungsgaben von 35 bis 40 Volt festgestellt werden konnte, wurden nur ungefähr 55 Prozent aller Embryonen mit 30-35 Volt positiv transfiziert.

D.1.2.8 Einfluss der Operationszeit

Der Parameter Operationszeit in Bezug auf das Überleben der manipulierten Embryonen wurde in diesem Abschnitt der Arbeit untersucht. In vorangegangenen Versuchsansätzen benötigten tragende Mäuse, die aufgrund von Komplikationen während der Manipulation (u. a. Kapillarspitzenbrüche, unterbundene Durchgängigkeit der Injektionskapillare, Narkosezwi-

schenfälle, Materialschwächen) über 30 Minuten lang operiert wurden, eine längere postoperative Erholungsphase. Ihre natürlichen Verhaltensweisen (Putzen, Fressen, Nest bauen, etc.) zeigten sich bei diesen Tieren erst wieder 4-6 Stunden nach der Operation. Dieser negative Einfluss hatte auch Auswirkungen auf die Vitalität der transfizierten Embryonen und somit auf den Erfolg der *In-utero*-Elektroporation.

Aus tierschutzrechtlichen Gründen wurden für diesen Versuchsansatz keine absichtlichen Komplikationen während der OP eingeleitet oder die Operationszeiten willentlich und unnötig hinausgezögert. Deshalb wurde diese Studie retrospektiv angelegt. Operationen, die länger als 30 Minuten pro Maus dauerten, wurden für diese Analyse ausgewählt. Für den Vergleich wurden aus den entsprechenden Versuchsgruppen Operationen, die unter 30 Minuten lagen, hinzugezogen. Es wurde die prozentuale Letalität der transfizierten (Abbildung 21 A) und der sich in den gleichen Uteri befindlichen nicht transfizierten Embryonen (Abbildung 21 B) für Operationen länger bzw. kürzer als 30 Minuten berechnet.

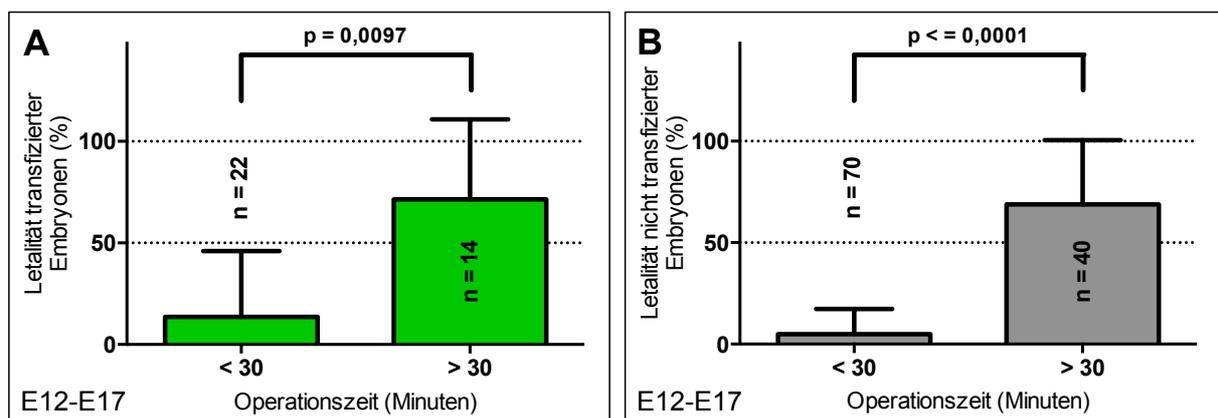


Abbildung 21: Prozentuale Berechnung der Wahrscheinlichkeit einer geringeren Sterblichkeit der Embryonen in Abhängigkeit von der Operationsdauer

In dieser retrospektiven Analyse zeigte sich, dass längere Operationszeiten (> 30 Minuten) eine höhere Wahrscheinlichkeit der Sterblichkeit (Letalität) der (A) transfizierten Embryonen zur Folge hatte. Die (B) nicht manipulierten Embryonen hatten ebenfalls eine höhere Letalität bei Operationszeiten von über 30 Minuten (Mann-Whitney-Test, Mittelwert mit SD, n = Anzahl der Embryonen, E = Embryonalstadium bei Transfektion, p = Signifikanzwert).

In kurzen Operationsintervallen, bis 30 Minuten, überlebten fast 90 Prozent der transfizierten Embryonen. In dieser Analyse kam es nach der *In-utero*-Elektroporation bei den transfizierten Embryonen, die länger als 30 Minuten operativ manipuliert wurden, zu einem signifikanten Anstieg der Letalität (Abbildung 21 A, Mann-Whitney-Test, Anzahl manipulierter Embryonen: n unter 30 Minuten = 22 und n über 30 Minuten = 14, E12-E17). Es konnten keine lebensfähigen Embryonen nach 40-minütigen Operationen nachgewiesen werden.

Gleiches zeigte sich auch bei den nicht manipulierten, in unmittelbarer Nachbarschaft zu den transfizierten Embryonen liegenden Uterusfrüchten. Eine hohe Sterbequote konnte bei Ope-

rationen, die länger als 30 Minuten gedauert haben, festgestellt werden. Kurzzeitig durchgeführte Operationen hatten keinen Einfluss auf die Letalität (Abbildung 21 B, Mann-Whitney-Test, Anzahl nicht manipulierter Embryonen: n unter 30 Minuten = 70 und n über 30 Minuten = 40, E12-E17).

D.1.2.9 Transfektionen mehrerer Plasmide *in vivo* (C57BL/6-Maus)

Im Folgenden Abschnitt dieser Arbeit sollten die Einsatzmöglichkeit von Transfektionen mehrerer Plasmide im gleichen Embryo und deren Auswertemöglichkeiten untersucht werden. Durch Transfektionen mehrerer Gene könnten komplexere zelluläre Auswirkungen studiert werden.

Es wurden für die hier geplanten Versuche Plasmide mit einer hohen Rate an erfolgreichen Transfektionen injiziert (siehe Abschnitt D.1.2.3). Dazu wurde in gleichbleibender Konzentration das Plasmid *pCAG-DsRed2* (Standardvektor), das eine rote Fluoreszenz in transfizierten Zellen zur Folge hatte, appliziert. Zusammen mit dem Standardvektor wurde in unterschiedlichen Konzentrationen das GFP-codierende Plasmid *pCAGGS* (Markierungsvektor), das durch eine grüne Fluoreszenz in transfizierten Zellen zu erkennen war, eingesetzt. Durch die Kombination dieser beiden Plasmide war es möglich, alle transfizierten Embryonen zu selektieren und die einzelnen Fluoreszenzeigenschaften der ausgewählten Plasmide getrennt den folgenden Zielsetzungen entsprechend auszuwerten.

Diese Plasmidmischungen wurden in kortikale Großhirnbereiche von 14 Tage alten Embryonen (E14, *p.c.*) transfiziert. Die Präparation und histologische Aufarbeitung der Gehirne erfolgte 4 Tage nach Transfektion (E18, *p.c.*).

D.1.2.9.1 Doppeltransfektion

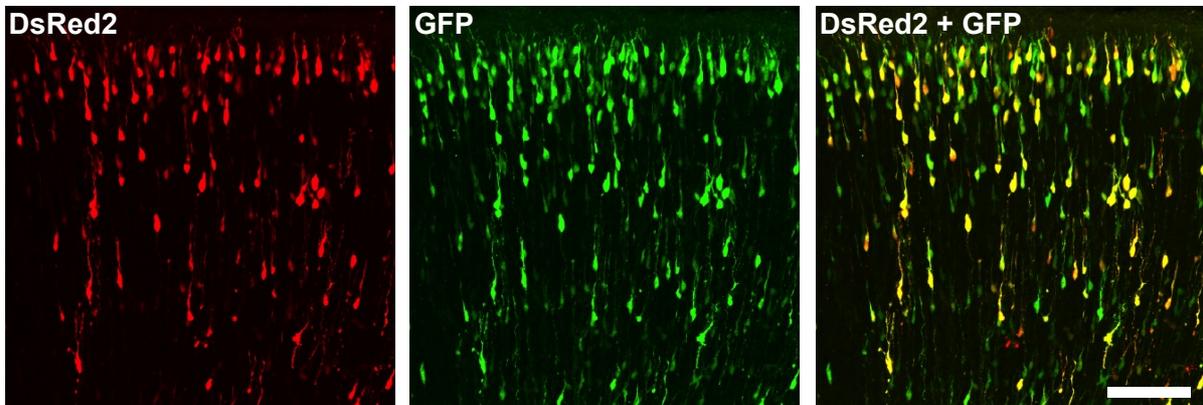
Im Folgenden wurde untersucht, ob eine gleichzeitige Transfektion von Großhirnhemisphären mit einem Standardvektor (codierte das zu untersuchende Protein = „gene of interest“) und einem Markierungsvektor (codierte zusätzliches Fluoreszenzprotein) möglich war. Ein Vorteil dieser Doppeltransfektion ist die Erhöhung der Fluoreszenz des Standardvektors. Damit könnte z. B. die Detektion von transfizierten Embryonen oder postnatalen (bis 28 Tage nach der Geburt) bzw. adulten Tieren erleichtert werden. Weiterhin könnte man Plasmide als Standardvektoren einsetzen, die keinen Genabschnitt für Fluoreszenzproteine codieren.

Eine Fehlerquelle bei einer Doppeltransfektion in gleichen Gewebebereichen ist die alleinige Transfektion von Zellen mit dem Markierungsvektor. Nur durch Ausschluss oder Minimierung

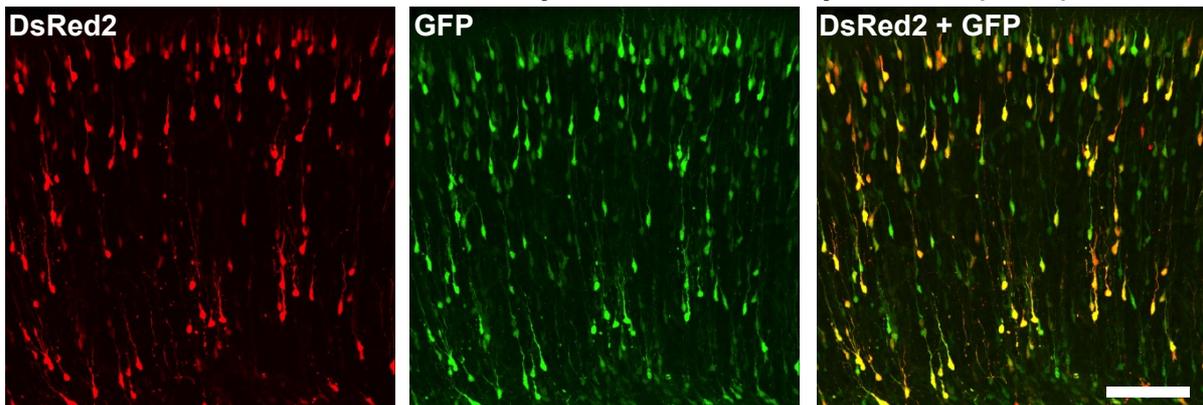
dieser Einzeltransfektion kann in späteren Transfektionsansätzen mit 2 oder mehreren Plasmiden, die die gleichen oder keine Fluoreszenzproteine codieren, gearbeitet werden. In den nachfolgenden Transfektionsversuchen wurde das optimale Mischverhältnis zwischen Standard- und Markierungsvektor gesucht. Das Ziel war es, ein Konzentrationsverhältnis zu bestimmen, dass das Fluoreszenzsignal des Standardvektors erhöht, aber gleichzeitig die Einzeltransfektion von Zellen durch den Markierungsvektor ausschließt.

Für diese Analyse wurden 4 unterschiedliche Konzentrationsverhältnisse zwischen dem Standardvektor *pCAG-DsRed2* (rote Fluoreszenz) und dem Markierungsvektor *pCAGGS* (grüne Fluoreszenz) untersucht (Abbildung 22, Mischverhältnis *pCAG-DsRed2* zu *pCAGGS*: (A) = 1:1, (B) = 1:1/2, (C) = 1:1/4 und (D) = 1:1/8).

A Konzentrationsverhältnis *pCAG-DsRed2* zu *pCAGGS* (1:1)



B Konzentrationsverhältnis *pCAG-DsRed2* zu *pCAGGS* (1:1/2)



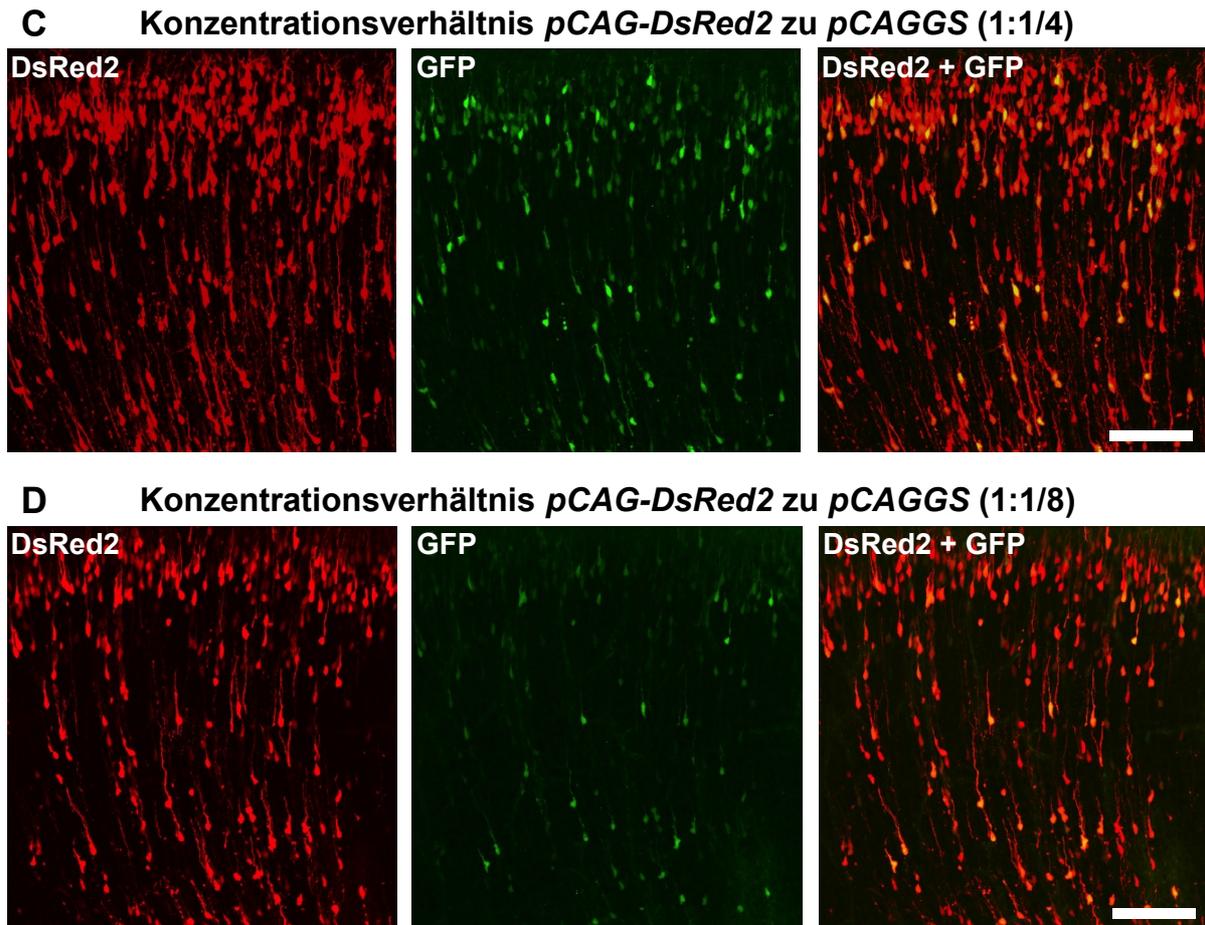


Abbildung 22: Bilder zur Doppeltransfektion neuronaler Zellen in kortikalen Großhirnbereichen mit den Plasmiden *pCAG-DsRed2* und *pCAGGS* *in vivo*

Die Aufnahmen mit (A) gleichen Konzentrationen und (B) einem Konzentrationsverhältnis von 1:1/2 (Standardvektor *pCAG-DsRed2* zu Markierungsvektor *pCAGGS*) zeigten im überlagerten Bild beider Fluoreszenzen (rechte Aufnahmereihe) ein dominierendes, grün fluoreszierendes Schnittbild. Erst ab Verhältnissen der Konzentrationen beider Plasmide von (C) 1:1/4 und (D) 1:1/8 (Standardvektor *pCAG-DsRed2* zu Markierungsvektor *pCAGGS*) dominierte die rote Fluoreszenz des Standardvektors (somatosensorische Kortexausschnitte der Großhirnanlage von 18 Tage alten transfizierten Embryonen (E18, *p.c.*), Fluoreszenzaufnahmen in der linken Reihe von DsRed2 = 2. Variante des rot fluoreszierenden Proteins („Red“) aus *Discosoma* *sp.*, in der mittleren Reihe von GFP = grün fluoreszierendes Protein aus *Aequorea victoria* und in der rechten Reihe beider Fluoreszenzen zusammen im gleichen Schnittbild, Messbalken = 100 Mikrometer).

Zur Erfassung der fluoreszenzverstärkenden Wirkung des zusätzlich eingebrachten Markierungsvektors *pCAGGS* bei einer erfolgreichen Doppeltransfektion mit dem Standardvektor *pCAG-DsRed2* wurden die manipulierten Embryonen quantitativ anhand der GFP-Signalarstärke ausgewertet. Für die statistische Berechnung wurde der prozentuale Anteil dieser erfolgreich transfizierten Embryonen ins Verhältnis zu nicht erfolgreich transfizierten Tieren gesetzt. In diesen Versuchsansätzen wurden unterschiedliche Konzentrationsverhältnisse des Markierungsvektors *pCAGGS* im Verhältnis zum Standardvektor *pCAG-DsRed2* einbezogen (Abbildung 23, Standardvektor *pCAG-DsRed2*: Konzentration = 4 Mikrogramm je Mikroliter, Injektionsvolumen 1 Mikroliter; Verstärkungsvektor *pCAGGS*: Konzentration = (1:1) 4 Mikro-

gramm je Mikroliter, (1:1/2) 2 Mikrogramm je Mikroliter, (1:1/4) 1 Mikrogramm je Mikroliter und (1:1/8) 0,5 Mikrogramm je Mikroliter, Injektionsvolumen 1 Mikroliter).

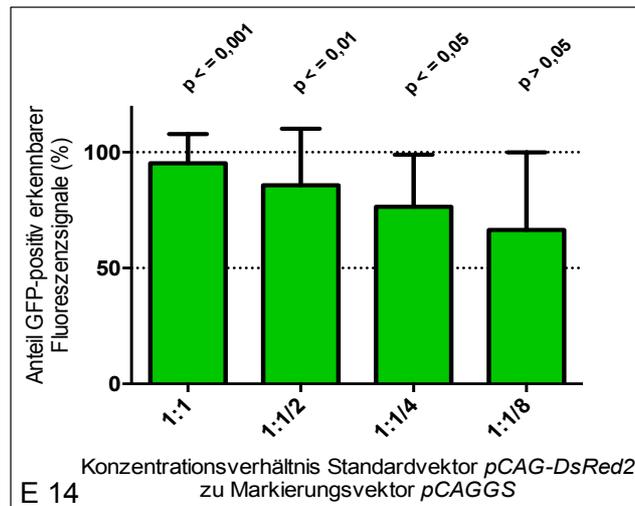


Abbildung 23: Untersuchung der Fluoreszenzerkennung durch Zugabe eines fluoreszenzverstärkenden Plasmids als Markierungsvektor *pCAGGS* zu einem Standardvektor *pCAG-DsRed2* in einer Doppeltransfektion

Mit abnehmender Konzentration des Markierungsvektors zeigte sich, anhand des schwächer gewordenen GFP-Signals, eine geringere Detektierbarkeit erfolgreich transfizierter Embryonen. Während fast alle manipulierten Embryonen bei hohen Konzentrationsverhältnissen des Markierungsvektors zum Standardvektor (1:1 und 1:1/2) detektiert werden konnten, waren es bei der geringsten Konzentration des Markierungsvektors (1:1/8) nur noch ungefähr 60 Prozent aller transfizierten Embryonen (Kruskal-Wallis-Test, Post-hoc-Test Dunns-Korrektur, Mittelwert mit SD, $n = 14$ transfizierte Embryonen je Plasmidmischverhältnis, $p =$ Signifikanzwert, Kontrolle = 0 Prozent Detektierbarkeit, E = Embryonalstadium bei Transfektion).

In dieser Testreihe wurden signifikante Unterschiede der Detektierbarkeit anhand des GFP-Signals des Standardvektors *pCAG-DsRed2* zum Markierungsvektors *pCAGGS* ab Konzentrationsverhältnissen von 1:1/4 festgestellt. Fast alle doppelt transfizierten Embryonen hatten bei hohen Konzentrationsverhältnissen des Markierungsvektors (1:1 und 1:1/2) ein deutliches GFP-Signal in den manipulierten Gewebebereichen (Abbildung 23, Kruskal-Wallis-Test, Post-hoc-Test Dunns-Korrektur, Mittelwert mit SD, $n = 14$ transfizierte Embryonen je Plasmidmischverhältnis).

In einer weiterführenden Analyse der vorangegangenen Versuchsreihe mit unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen beider Plasmide (Standardvektor *pCAG-DsRed2* und Markierungsvektor *pCAGGS*), sollte auf zellulärer Ebene der prozentuale Anteil grün fluoreszierender Zellen (GFP-einzelpositiv), die keine rote Fluoreszenz (GFP- und DsRed2-doppeltpositiv) besaßen, bestimmt werden. Auf diese Weise konnte eine Aussage getroffen werden, welches Konzentrationsverhältnis zwischen Standard- und Markierungsvektor keine oder eine geringe Anzahl an GFP-einzelpositiven (Markierungsvektor *pCAGGS*) hatte.

Diese Analyse war erforderlich, um bei späteren Doppeltransfektionsversuchen den prozentualen Fehler einer Einzeltransfektion durch den Markierungsvektor einzuberechnen. Dafür wurden fluoreszierende Zellen von histologisch aufgearbeiteten Schnitten der transfizierten motorischen und somatosensorischen Kortexbereiche der Großhirnanlage gezählt (Gesichtsfeld = 450 x 500 Mikrometer, 3 Gesichtsfelder je Embryo, n = 5 Embryonen je Konzentrationsverhältnis, 4 Konzentrationsverhältnisse zwischen Standard- und Markierungsvektor = 1:1, 1:1/2, 1:1/4 und 1:1/8).

Der prozentuale Anteil GFP-einzelpositiver Zellen (= nur mit Markierungsvektor transfiziert) wurde im Verhältnis zu allen positiv transfizierten Zellen (GFP-einzel-, DsRed2-einzel- und GFP+DsRed2-doppeltpositive Zellen) je Gesichtsfeld analysiert (Abbildung 24).

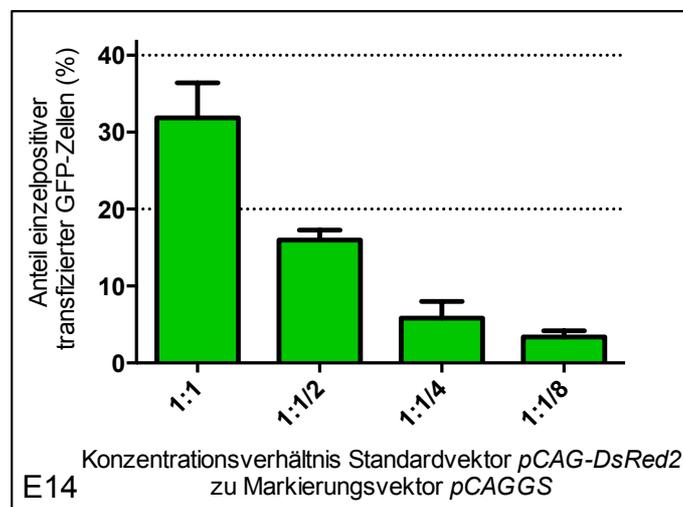


Abbildung 24: Bestimmung der prozentualen Häufigkeit von GFP-einzelpositiven Zellen bei unterschiedlichen Transfektionsmischungen zwischen Standard- (*pCAG-DsRed2*) und Markierungsvektor (*pCAGGS*)

Nach Doppeltransfektionen mit Standard- und Markierungsvektor im Konzentrationsverhältnis von 1:1 waren mehr als 30 Prozent aller Zellen allein mit dem Markierungsvektor transfiziert worden. Bei einem Konzentrationsverhältnis von 1:1/2 waren es mehr als 15 Prozent aller transfizierten Zellen. Ab Konzentrationsverhältnissen von 1:1/4 wurden ungefähr 5 Prozent aller Zellen nur mit dem Markierungsvektor transfiziert. In der geringsten eingesetzten Konzentration des Markierungsvektors (Verhältnis *pCAG-DsRed2*:*pCAGGS* = 1:1/8) waren 3 Prozent aller manipulierten Zellen GFP-einzelpositiv (Kruskal-Wallis-Test, Mittelwert mit SD, n = 5 Gewebeschnitte/transfizierte Embryonen je Plasmidmischungsverhältnis, E = Embryonalstadium bei Transfektion)

Die prozentuale Berechnung der doppelt transfizierten Gewebereiche ergab, dass bei gleichen Plasmidmischungen zwischen Standard- (*pCAG-DsRed2*) und Markierungsvektor (*pCAGGS*) mehr als 30 Prozent aller fluoreszierender Zellen GFP-einzelpositiv und somit nur mit dem Markierungsvektor transfiziert waren.

Mit Änderung des Konzentrationsverhältnisses zwischen *pCAG-DsRed2* (Standardvektor) und *pCAGGS* (Markierungsvektor) auf 1:1/2 sank auch der prozentuale Anteil der nach Transfektion detektierten, GFP-einzelpositiven Zellen auf ungefähr 15 Prozent.

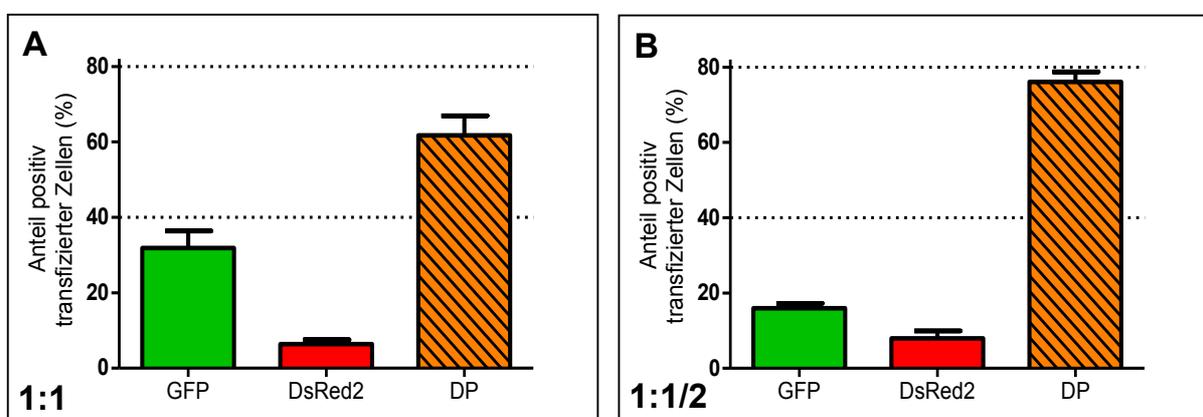
Eine deutliche Abnahme auf 5-6 Prozent, der nur mit dem Markierungsvektor transfizierten Zellen (GFP-einzelpositiv) stellte sich nach Injektionen und Elektroporationen von Plasmidkonzentrationsmischverhältnissen zwischen Standard- und Markierungsvektor von 1:1/4 ein.

Diese Korrelation zwischen Halbierung der Konzentration des Markierungsvektors zur prozentualen Häufigkeit der GFP-einzelpositiven Zellen zeigte sich auch bei der geringsten eingesetzten Konzentration von *pCAGGS* (0,5 Mikrogramm je Mikroliter, Volumen 1 Mikroliter, Konzentrationsverhältnis Standardvektor zu Markierungsvektor = 1:1/8). In dieser Analyse wurden nur rund 3 Prozent aller transfizierten, fluoreszierender Zellen GFP-einzelpositiv detektiert (Abbildung 24, Kruskal-Wallis-Test, $P = 0,0002$, $n = 5$ transfizierte Embryonen je Plasmidmischverhältnis).

D.1.2.9.2 Doppeltransfektion in der gleichen Großhirnhemisphäre

In folgenden Doppeltransfektionsversuchen wurde weiter die Möglichkeit untersucht, ob *In-utero*-Elektroporationen von 2 oder mehr Plasmiden, die unterschiedliche Gene codieren, im selben Gewebeabschnitt analysierbar sind. Solche Versuchsreihen könnten z. B. bei Untersuchungen der Überexpression sowie der Herunterregulation von Proteinen angewendet werden.

Die unter Abschnitt D.1.2.9.1 erhobenen Daten der prozentualen Auszählungen GFP-einzelpositiver Zellen unterschiedlicher Plasmidkonzentrationsverhältnisse wurden in dieser Auswertung mit den DsRed2-einzelpositiven und den doppelpositiven (DP = GFP- und DsRed2-positiv) Zellen ins Verhältnis gesetzt (Abbildung 25, motorische und somatosensorische Kortexbereiche der Großhirnanlage, Gesichtsfeld = 450 x 500 Mikrometer, 3 Gesichtsfelder je Embryo, $n = 5$ Embryonen je Konzentrationsverhältnis, 4 Konzentrationsverhältnisse zwischen Standard- und Markierungsvektor = (A) 1:1, (B) 1:1/2, (C) 1:1/4 und (D) 1:1/8).



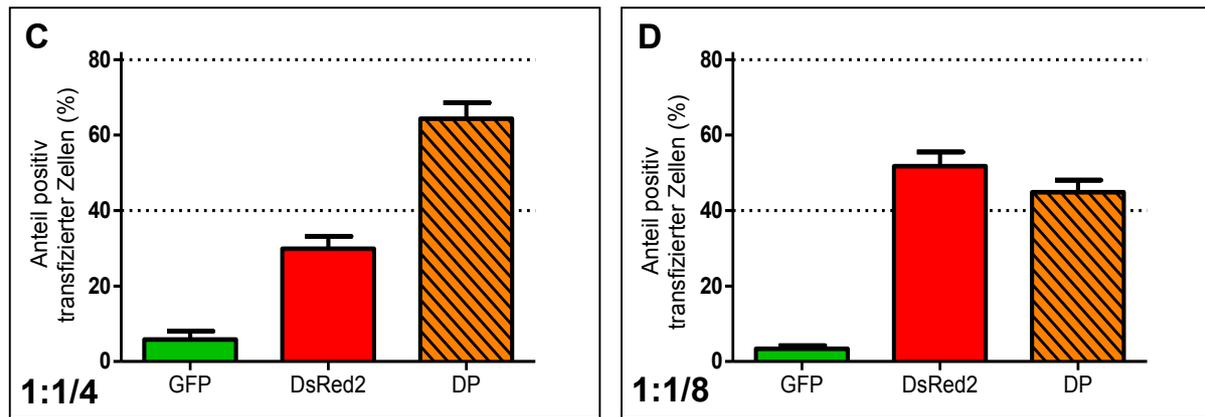


Abbildung 25: Prozentuale Verteilung einzel- und doppelpositiver, transfizierter neuronaler Zellen

Das Plasmid *pCAGGS* (Markierungsvektor) wurde kombiniert mit dem Standardvektor *pCAG-DsRed2* in unterschiedlichen Konzentrationen transfiziert. Die positiven, fluoreszierenden Zellen der kortikalen Großhirnanlage wurden gezählt und im prozentualen Verhältnis zueinander ausgewertet (Konzentrationsverhältnis Standard- zu Markierungsvektor = (A) 1:1, (B) 1:1/2, (C) 1:1/4 und (D) 1:1/8, DsRed2 = 2. Variante des rot fluoreszierenden Proteins („Red“) aus *Discosoma sp.*, GFP = grün fluoreszierendes Protein aus *Aequorea victoria*, DP = doppelpositiv, Kruskal-Wallis-Test, Mittelwert mit SD, n = 5 Embryonen je Plasmidmischungsverhältnis).

Bei einer Transfektion beider Plasmide im gleichen Mischverhältnis zeigte sich, dass der Anteil GFP-einzelpositiver Zellen durchschnittlich bei 30 Prozent, der Anteil DsRed2-einzelpositiver Zellen bei rund 5 Prozent und der größte Anteil die doppelpositiven Zellen mit über 60 Prozent betrug.

Plasmidmischungsverhältnisse von 1:1/2 zwischen Standard- zu Markierungsvektor hatten den höchsten prozentualen Anteil an doppelpositiven Zellen von ungefähr 75 Prozent im Vergleich zu allen anderen getesteten Konzentrationsmischungen. Die prozentualen Anteile der einzelpositiven Zellen war hier ähnlich hoch bei 10 Prozent (DsRed2) und 15 Prozent (GFP) (Kruskal-Wallis-Test, (A) und (B) $P = 0,0019$, n = 5 transfizierte Embryonen je Plasmidmischungsverhältnis, Abbildung 25).

Ab Konzentrationsmischungen der beiden Plasmide von 1:1/4 (Standard- zu Markierungsvektor) änderte sich die prozentuale Verteilung. Ab hier stieg der Anteil DsRed2-einzelpositiver Zellen stark an. Bei einem Verhältnis von 1:1/8 lag der Anteil der DsRed2 positiven Zellen bei über 50 Prozent. Der höchste Anteil der GFP-einzelpositiven Zellen hingegen wurde bei gleichen Konzentrationsverhältnissen (Standard- zu Markierungsvektor) der eingesetzten Plasmide detektiert. Der prozentuale Anteil der doppelpositiven Zellen sank bei einem Verhältnis von 1:1/8 unter 50 Prozent aller positiv transfizierten Zellen (Kruskal-Wallis-Test, (C) $P = 0,0019$, (D) $P = 0,0037$, n = 5 transfizierte Embryonen je Plasmidmischungsverhältnis, Abbildung 25).

D.1.2.9.3 Doppeltransfektion in den unterschiedlichen Großhirnhemisphären

Im folgenden Abschnitt dieser Arbeit wurde eine weiterführende Studie mit Transfektionen 2er Plasmide in lokal unterschiedlichen Hemisphären der Großhirnanlage durchgeführt. Ziel war es, den prozentualen Anteil einzeltransfizierter Zellen durch Änderung der Plasmidinjektions- und Elektroporationsstrategie in einem Embryo gegenüber den schon gewonnenen Daten aus Abschnitt D.1.2.9.2 zu erhöhen. Dadurch würde es in anschließenden Versuchen ermöglicht, dass in einem Tier unterschiedliche Proteine einzeln in ihren zellulären Auswirkungen im neuronalen Gewebe studiert werden können.

Embryonen (E14, *p.c.*) wurden in einen der lateralen Ventrikel mit dem GFP-exprimierenden Plasmid *pCAGGS* injiziert und elektroporiert. In der Folge wurde die Injektion des Plasmids *pCAG-DsRed2* in den kontralateralen Ventrikel mit anschließender Elektroporation durchgeführt (Abbildung 26).

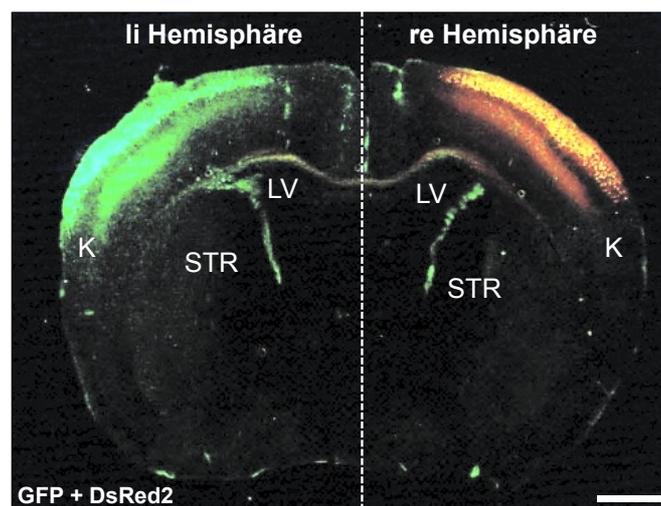


Abbildung 26: Doppeltransfektion von 2 verschiedenen Plasmiden in unterschiedlichen Hemisphären

Beispielbild einer erfolgreichen Doppeltransfektion mit Standard- (*pCAG-DsRed2* = rote Fluoreszenz) und Markierungsvektor (*pCAGGS* = grüne Fluoreszenz) in unterschiedlichen Hemisphären des kortikalen Großhirns (P21, li = links, re = rechts, DsRed2 = 2. Variante des rot fluoreszierenden Proteins („Red“) aus *Discosoma sp.*, GFP = grün fluoreszierendes Protein aus *Aequorea victoria*, LV = lateraler Ventrikel, K = Kortex, STR = Striatum, Messbalken = 1 Millimeter)

Für diesen Transfektionsversuch wurden der Standardvektor (*pCAG-DsRed2*) und der Markierungsvektor (*pCAGGS*) in gleicher Konzentration injiziert (Konzentration 2 Mikrogramm je Mikroliter, Volumen = 1 Mikroliter, *pCAGGS* in den linken und *pCAG-DsRed2* in den rechten lateralen Ventrikel). Für die Auszählungen wurden GFP-einzelpositive, DsRed2-einzelpositive und doppelpositive (GFP- und DsRed2-positiv) Zellen der einzelnen transfizierten Hemisphären von 18 Tage alten Gehirnen ausgewertet und ihr prozentuales Verhältnis berechnet (Abbildung 27 A und B, motorische und somatosensorische Kortexbereiche der

Großhirnanlage, Gesichtsfeld = 450 x 500 Mikrometer, 3 Gesichtsfelder je Embryo, n = 5 transfizierte Embryonen).

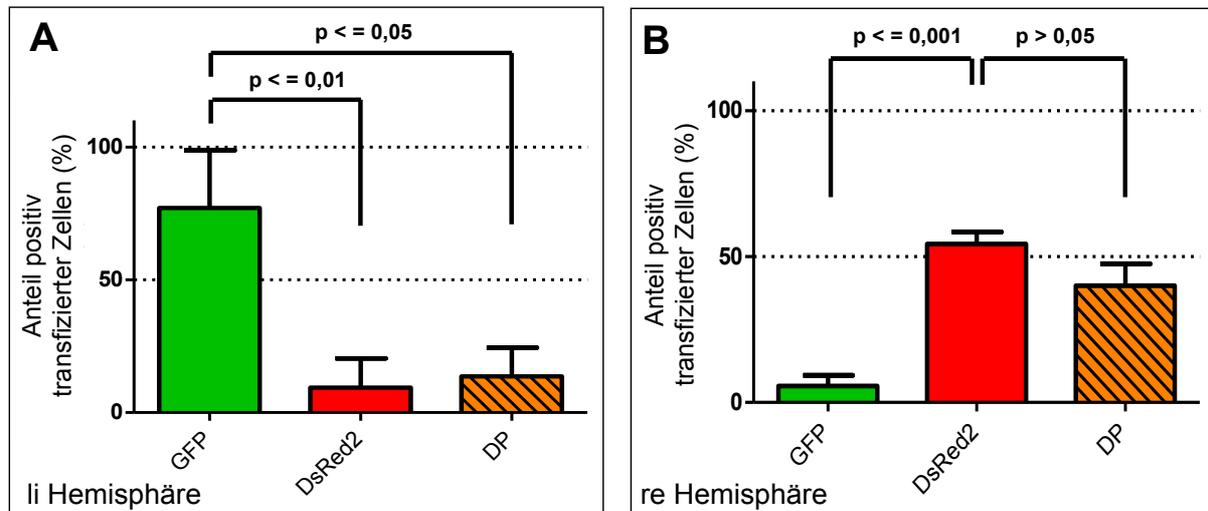


Abbildung 27: Prozentuale Verteilung transfizierter Zellen nach Injektion 2er Plasmide in unterschiedlichen Hemisphären desselben Embryos

(A) stellt die prozentuale Verteilung der fluoreszierenden Zellen der linken Hemisphäre dar, die gezielt mit dem Plasmid *pCAGGS* (Markierungsvektor) transfiziert wurde. Die Grafik (B) zeigt die Verteilung der positiven Zellen der rechten Hemisphäre, die gezielt mit dem Plasmid *pCAG-DsRed2* (Standardvektor) transfiziert wurde. (DsRed2 = 2. Variante des rot fluoreszierenden Proteins („Red“) aus *Discosoma sp.*, GFP = grün fluoreszierendes Protein aus *Aequorea victoria*, DP = doppeltpositiv, Kruskal-Wallis-Test, Post-hoc-Test Dunns-Korrektur, Mittelwert mit SD, n = 5 transfizierte Embryonen, p = Signifikanzwert).

Der prozentuale Anteil der einzeln fluoreszierenden Zellen zeigte eine unterschiedliche Verteilung zwischen beiden transfizierten Hemisphären. Die GFP-einzelpositiven Zellen waren deutlich mit fast 80 Prozent in der mit dem Plasmid *pCAGGS* (Markierungsvektor) transfizierten kortikalen Großhirnregion nachweisbar. In dieser Hemisphäre konnten nur vereinzelte DsRed2-einzel- und doppeltpositive Zellen gefunden werden (Abbildung 27 A, Kruskal-Wallis-Test, Post-hoc-Test Dunns-Korrektur Mittelwert mit SD, n = 5 transfizierte Embryonen).

In der mit dem Plasmid *pCAG-DsRed2* transfizierten kortikalen Hemisphäre waren über 50 Prozent aller fluoreszierenden Zellen DsRed2-einzelpositiv. Der Anteil der GFP-einzelpositiven Zellen lag bei unter 5 Prozent. Der prozentuale Anteil der doppeltpositiven, fluoreszierenden Zellen (GFP- und DsRed2-positiv) lag ungefähr bei 40 Prozent und war im Vergleich mit der linken Hemisphäre höher (Abbildung 27 B, Kruskal-Wallis-Test, Post-hoc-Test Dunns-Korrektur, Mittelwert mit SD, n = 5 transfizierte Embryonen).

D.1.3 Modifikation der Zusammensetzung von Zellbestandteilen *in vivo*

Ein Ziel der Transfektionen durch die *In-utero*-Elektroporation bestand darin, dass man durch das Einbringen eines zusätzlichen DNS-Abschnittes eine bestimmte Proteinbildung in der Zielzelle erzwingen konnte. Eine verstärkte oder verminderte Expression von Proteinen bietet die Möglichkeit, bestimmte Gene, Proteine oder Stoffwechselkaskaden gezielt zu manipulieren. Für den Nachweis dieser Modifikationen sollten in den nachfolgenden Versuchen direkte und indirekte Analyseverfahren der Transfektion getestet werden.

Für eine direkte Kontrolle einer erfolgreichen Transfektion wurden die Proteine, die durch die transfizierten Plasmide codiert waren, durch Antikörpermarkierungen direkt nachgewiesen. Um die durch Manipulation eingebrachten Genprodukte von den natürlich vorkommenden Zellbestandteilen unterscheiden zu können, wurden Plasmide mit zusätzlichen DNS-Abschnitten für spezielle Epitope (Markierungssequenz = „Epitop-Tag“), die an der Gensequenz des zu untersuchenden Proteins codiert waren, genutzt. Nach einer erfolgreichen Transfektion konnten die gebildeten, modifizierten Proteine durch Antikörperbindungen an diesen Epitopen nachgewiesen werden.

Für eine indirekte Kontrolle wurden meist Plasmide genutzt, die nicht nur den „fremden“ DNS-Abschnitt, sondern auch Markierungssysteme in Form von Fluoreszenzfarbstoffkassetten (GFP, DsRed, YFP, CFP u. a.) besaßen (siehe auch Abschnitt D.1.2). Eine weitere indirekte Kontrollmöglichkeit bot die Analyse veränderter Proteinbildungen in der Zielzelle durch Antikörpermarkierungen oder den Nachweis von Stoffwechselprodukten. Zur Feststellung einer erfolgreichen *In-utero*-Elektroporation im Zielgewebe wurden diese direkten und indirekten Kontrollmöglichkeiten nachfolgend *in vivo* getestet.

D.1.3.1 Direktes Nachweisverfahren einer erfolgreichen Transfektion

Im Folgenden wurde das Plasmid *pCAG-mPRG1(FLAG)* (siehe Abschnitt C.2.2) *in vivo* transfiziert. Durch die Markierungssequenz *FLAG-Tag* (Peptidsequenz: DYKDDDDK) an das zu transfizierende Protein PRG-1 konnte der direkte Nachweis des modifizierten PRG-1-Proteins durch Fluoreszenzantikörperbindung gegen das *Epitop-Tag* nach erfolgreicher Transfektion gezeigt werden. Ein Embryo wurde im 14. Tag seiner Entwicklung (E14, *p.c.*) mit diesem Plasmid im kortikalen Großhirnbereich transfiziert. Das hier genutzte Plasmid *pCAG-mPRG1(FLAG)* codierte eine GFP-Kassette, die die modifizierten Zellen zusätzlich durch grüne Fluoreszenzproteine detektieren lässt. 4 Tage nach der *In-utero*-Elektroporation

wurde das Großhirn des Embryos (E18, *p.c.*) präpariert und immunhistologisch aufgearbeitet (Abbildung 28).

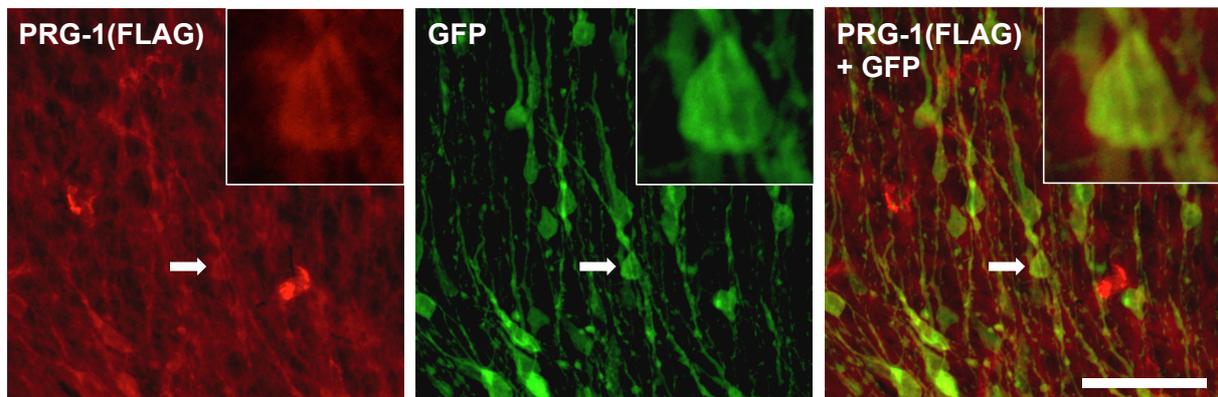


Abbildung 28: *pCAG-mPRG-1(FLAG)*-transfizierten Neuronen in der kortikalen Platte des Großhirns eines Mausembryos

In den mit dem Plasmid *pCAG-mPRG-1(FLAG)* manipulierten Neuronen konnte mit FLAG-Antikörpern, die mit roten Fluoreszenzproteinen (linkes Bild: PRG-1(FLAG), sekundärer Antikörper Alexa 568) gekoppelt waren, die Bildung der transfizierten Proteine PRG-1 nachgewiesen werden. Es konnte eine Kolorisation mit den grün fluoreszierenden Proteinen (Bild Mitte: GFP, sekundärer Antikörper Alexa 488), die durch Transfektion der GFP-Kassette des Plasmids in die Zelle verbracht wurden, festgestellt werden (rechtes Bild: PRG-1(FLAG) + GFP; weißer Pfeil zeigt den Ausschnittbereich rechts oben: Vergrößerung eines PRG-1(FLAG)- und GFP-positiven Neurons, Messbalken 50 Mikrometer, $n = 1$ transfizierter Embryo, E18 *p.c.*)

Durch die Bindung des fluoreszenzgekoppelten Antikörpers an die Markierungssequenz *FLAG-Tag* an der PRG-1-Gensequenz konnte in den Gewebeschnitten nach Transfektion direkt die Bildung modifizierter PRG-1-Proteine nachgewiesen werden (Abbildung 28, PRG-1(FLAG), linkes Bild, weißer Pfeil). Diese Fluoreszenzmarkierung wurde mit der grünen Fluoreszenz des GFPs verglichen (Abbildung 28, GFP, Bild Mitte, weißer Pfeil). Es konnten Kolorisationen beider Fluoreszenzen in transfizierten Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 28, GFP, rechtes Bild, weißer Pfeil).

D.1.3.2 Indirekte Nachweisverfahren einer erfolgreichen Transfektion

Die *In-utero*-Elektroporation der Cre-Rekombinase in dem B6.129S4-*Gt(ROSA)-26Sor^{tm1Sor}*/J-Mausstamm (kurz: ROSA26-loxP, Stock: 003474, The Jackson Laboratory, Maine, USA) wurde zur indirekten Kontrolle einer erfolgreichen Transfektion „fremder“ DNS-Sequenzen durch die *In-utero*-Elektroporation angewendet.

Für diese Studie wurde das Plasmid *pCAG-Cre* („cyclization recombinase“, siehe Abschnitt C.2.2) in 14 Tage alte Embryonen (E14, *p.c.*) des ROSA26-loxP-Mausstamms transfiziert. In diesem transgenen Mausstamm wurde eine zusätzliche Gensequenz (*E. coli - lacZ-Gen*), die für das Enzym Beta-Galaktosidase codiert, im Chromosom 6 eingeführt („knock in“). Durch

die Transfektion der Zellen mit dem Plasmid *pCAG-Cre* wurde die Expression der Cre-Rekombinase verstärkt. Die exzidierenden Eigenschaften der Cre-Rekombinase an modifizierten Gensequenzen ermöglichen die Transkription des *lacZ-Gens* in der ROSA26-loxP Maus und fördern damit die Expression der Beta-Galaktosidase (siehe Abschnitt C.1.2). Durch spezifischen Antikörper gegen die Beta-Galaktosidase konnten die Bildung der Cre-Rekombinase und ihre Aktivität nachgewiesen werden. Als weitere indirekte Kontrolle konnte die enzymatische Aktivität der Beta-Galaktosidase durch Stoffwechselprodukte in der X-Gal-Färbung gezeigt werden (siehe Abschnitt C.3.4.2). Das eingebrachte Plasmid *pCAG-Cre* codierte zusätzlich die Gensequenz einer GFP-Kassette, wodurch transfizierte Zellen anhand von grünen Fluoreszenzproteinen erkannt werden können. Transfizierte Embryonen wurden 4-5 Tage nach Transfektion (E18-E19, *p.c.*) fixiert und die Großhirne immunhistologisch aufgearbeitet.

D.1.3.2.1 Nachweis durch Antikörpermarkierung

Mit dem Plasmid *pCAG-Cre* transfizierte Zellen im kortikalen Großhirnbereich wurden durch Fluoreszenzantikörpermarkierung gegen GFP (sekundärer Antikörper Alexa 488) mikroskopisch detektiert. Der Nachweis der Bildung des Enzyms Beta-Galaktosidase erfolgte durch eine weitere Fluoreszenzantikörpermarkierung (sekundärer Antikörper Alexa 568) in den transfizierten Gewebebereichen (Abbildung 29).

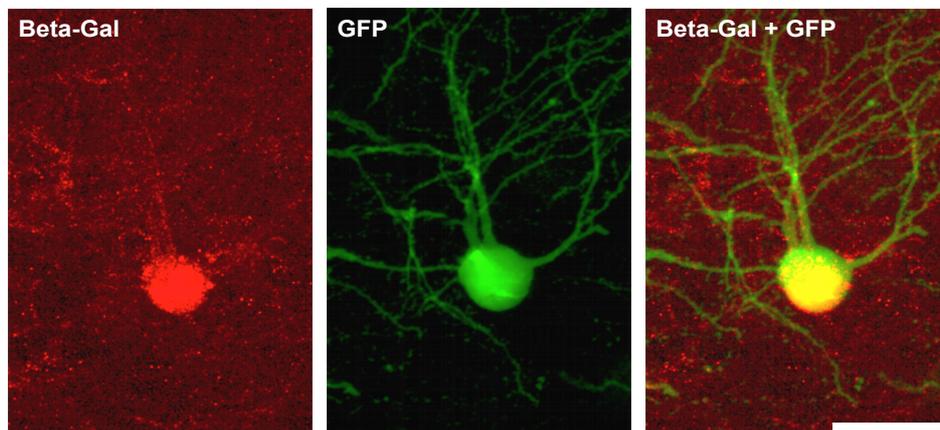


Abbildung 29: Mit dem Plasmid *pCAG-Cre* transfizierte Zelle des kortikalen Großhirns eines ROSA26-loxP-Embryos

Bild links zeigt eine positive Fluoreszenzmarkierung für die in der Zelle gebildete Beta-Galaktosidase (Beta-Gal), die durch Wirkung der Cre-Rekombinase verstärkt gebildet wurde. Mittleres Bild zeigt die dazugehörige GFP-Färbung zum Nachweis einer erfolgreichen Transfektion mit dem ebenfalls GFP-codierenden Plasmid. Im rechten Bild konnte die Kolokalisation der Antikörpermarkierungen gegen Beta-Galaktosidase und dem vom Plasmid exprimierten GFP nachgewiesen werden ($n = 1$ transfizierter Embryo, E18 *p.c.*, Messbalken = 10 Mikrometer).

Eine erfolgreiche *In-utero*-Elektroporation mit dem Plasmid *pCAG-Cre*, führte zur Bildung des Enzyms Cre-Rekombinase und des fluoreszierenden Proteins GFP in den transfizierten kortikalen Zellen der Großhirnhemisphären. Die verstärkte Bildung der Beta-Galaktosidase durch die Cre-Rekombinase konnte durch die Bindung von fluoreszenzgekoppelten Antikörpern in transfizierten Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 29, linkes Bild, Beta-Gal). Die in den Zellen vorhandene grüne Fluoreszenz der im Plasmid codierten GFP-Kassette bestätigte die erfolgreiche Transfektion mit dem Plasmid *pCAG-Cre* (Abbildung 29, Bild Mitte, GFP). Die Antikörpermarkierungen von Beta-Galaktosidase und von GFP waren kolokalisiert (Abbildung 29, rechtes Bild, Beta-Gal + GFP).

D.1.3.2.2 Nachweisverfahren durch Aktivitätsnachweis (Enzym)

Mit dem vorangegangenen Versuch konnte durch Transfektion des Plasmids *pCAG-Cre* die verstärkte Expression der Beta-Galaktosidase nachgewiesen werden. In dieser Studie sollte die Funktionsfähigkeit der induzierten Expression des Plasmids durch die Aktivität der Beta-Galaktosidase in den transfizierten Zellen untersucht werden. Für diesen Nachweis wurden aufgearbeitete Gewebeschnitte transfizierter Großhirnbereiche (4-5 Tage nach IUE) mit einem chromogenen Substrat (Farbstoff 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) inkubiert. Dieses wurde durch Hydrolyse der Beta-Galaktosidase in Galaktose und 5-Brom-4-chlor-3-hydroindoxyl gespalten. Durch Zugabe von Sauerstoff entstand ein blauer Farbstoff (Indigo), der sich in den transfizierten Zellen einlagerte (Abbildung 30 unten, X-Gal-Färbung, siehe Abschnitt C.3.4.2). Die Funktionsfähigkeit des Enzyms (Aktivität) kann somit durch eine Blaufärbung im Zytoplasma bewiesen werden (Burn 2012).

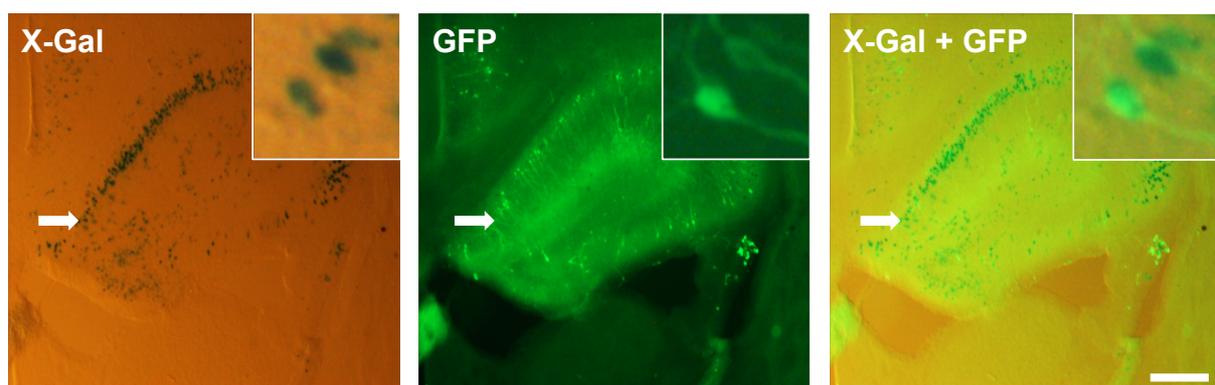


Abbildung 30: Enzymaktivitätsnachweis der transfizierten Cre-Rekombinase in ROSA26-loxP-Embryo (X-Gal-Färbung)

Linkes Bild zeigt eine Durchlichtaufnahme eines frontal angeschnittenen Hippocampus mit der Blaufärbung nach X-Gal-Färbung (X-Gal). Mittleres Bild zeigt die GFP-Färbung zum Nachweis einer erfolgreichen Transfektion mit dem Plasmid *pCAG-Cre* in dieser Region (GFP). Rechtes Bild zeigt die Kolokalisation der blau angefärbten mit den GFP-positiven Zellen. Die Kästen rechts oben zeigen vergrößerte Ausschnitte (weißer Pfeil) von X-Gal und GFP-positiven Neuronen (n = 1 transfizierter Embryo, E19, Messbalken = 200 Mikrometer).

Im Lichtmikroskop wurde eine deutliche Blaufärbung in den transfizierten Gewebebereichen nach X-Gal-Färbung detektiert (Abbildung 30, linkes Bild, X-Gal). Die ebenfalls durch das Plasmid codierten grün fluoreszierenden Proteine (Abbildung 30, Bild Mitte, GFP) konnten in den gleichen Zellen, die den blauen Farbstoff eingelagert hatten, nachgewiesen werden (Abbildung 30, rechtes Bild, X-Gal + GFP).

D.1.4 Geeignete Regionen für Plasmidtransfektionen

Nachdem der Erfolg von Transfektionen *in vivo* bestätigt werden konnte und die dafür nötigen Parameter der *In-utero*-Elektroporation etabliert worden waren, wurden die Einsatzmöglichkeiten dieser Technik im zentralen Nervensystem der Maus ermittelt. Aufgrund der anatomischen Limitation von neuronalen Vorläuferzellschichten und Plasmidinjektionsorten *in vivo* (siehe Abschnitt B.2) konzentrierte sich diese Untersuchung auf Großhirnbereiche, die in unmittelbarer Nachbarschaft zum Ventrikelsystem standen. Ziel war es, Transfektionsstandards für zelluläre Manipulation des zentralen Nervensystems festzulegen und für weiterführende Forschung zur Verfügung zu stellen.

D.1.4.1 Kortextbereiche des Großhirns

Aus der kortikalen Großhirnanlage sollten neben dem bisher manipulierten somatosensorischen und motorischen Kortex auch weitere kortikale Regionen wie der retrospleniale und piriforme Kortex manipuliert werden. Es wurde für diese Transfektionsversuche in die lateralen Ventrikel von 14 Tage alten Embryonen (E14, *p.c.*) ein GFP-codierendes Plasmid (*pCAGGS*, Konzentration 4 Mikrogramm je Mikroliter) injiziert und in die kortikalen Bereiche des Großhirns transfiziert. Es wurden unterschiedliche Winkel der Pluspol-Elektrode für die gewollten Transfektionsregionen manuell angesetzt (Abbildung 31 A, retrosplenialer Kortex 330-0 Grad, motorischer Kortex 0-40 Grad, somatosensorischer Kortex 40-95 Grad und piriformer Kortex = 95-110 Grad).

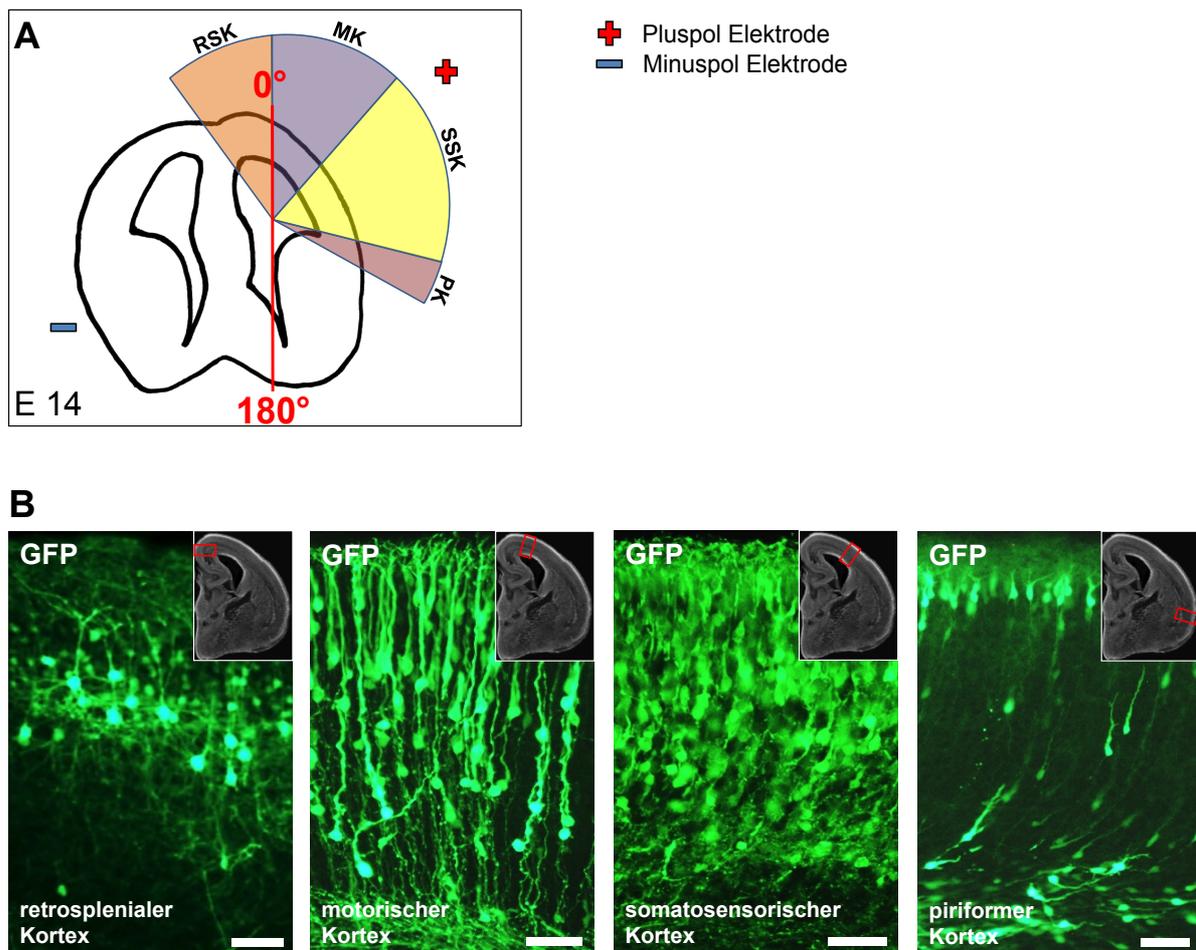


Abbildung 31: Transfektionsstandards zur Manipulation kortikaler Zellen der Großhirnbereiche durch die *In-utero*-Elektroporation

(A) Darstellung der Winkel der Pluspol-Elektrode für eine erfolgreiche Transfektion des retrosplenialen (RSK), motorischen (MK), somatosensorischen (SSK) und piriformen Kortexbereiches (Grafik der frontalen Schnittansicht des murinen Großhirns mit Winkelangaben im Entwicklungsstadium E14, *p.c.*). (B) Fluoreszenzaufnahmen nach erfolgreicher Transfektion der Winkelvorgaben aus Grafik (A), dargestellt durch GFP-positive, kortikale Neuronen dieser Regionen (vergrößerte Aufnahme (Rechteck) aus der Übersichtsaufnahme, Messbalken = 50 Mikrometer, E18).

Für die Angaben der richtigen Winkel der Elektrode (Pluspol) wurden die Transfektionen, die zwischen 70 und 100 Prozent der positiv transfizierten Zellen in den gewünschten Regionen besaßen, gewählt (Abbildung 31 A). In den kortikalen Bereichen wurden 4 Tage nach der Transfektion mit dem Plasmid *pCAGGS* (E18, *p.c.*) GFP-positive Zellen nachgewiesen.

Es konnten mit Winkelansätzen der Pluspolelektrode von 330-0 Grad hauptsächlich kortikale Zellen des retrosplenialen Kortex transfiziert werden (Abbildung 31 B, linkes Bild). Zellen aus dem motorischen Kortex ließen sich mit Winkelvorgaben der Elektroden von 0 bis 40 Grad transfizieren (Abbildung 31 B, 2. Bild von links). Angrenzende Winkelansätze des Pluspols der Elektrode bis 95 Grad zur Nullachse transfizierten hauptsächlich Vorläuferzellen, die Tochterzellen in den somatosensorischen Kortex migrieren ließen (Abbildung 31 B, 3. Bild

von links). Zellen, die im piriformen Kortexbereich der Großhirnanlage migrieren, konnten mit Pluspolelektrodenansätzen im Winkel von 95 bis 110 Grad gezielt transfiziert werden (Abbildung 31 B, 4. Bild von links).

D.1.4.2 Hippocampusformation

Aus dem Bereich des Allokortex wurde versucht, die einzelnen Hippocampusformationen mit dem Ammonshorn (*Cornu ammonis*, CA) und den *Gyrus dentatus* (GD) zu transfizieren. Für eine erfolgreiche Transfektion von Zellen in der Hippocampusformation wurden an 14-16 Tage alten Embryonen (E14-E16) *In-utero*-Elektroporationen durchgeführt.

Nach Injektion der Plasmide (*pCAGGS*, Konzentration 4-8 Mikrogramm je Mikroliter) in einen der lateralen Ventrikel wurde für Transfektionen des *Gyrus dentatus* ein Winkel des Pluspols von 190 bis 210 Grad, für die CA3-Region von 210 bis 230 Grad, für die CA2-Region von 230 bis 250 Grad und für die CA1-Region des Ammonshorns von 250 bis 275 Grad verwendet (Abbildung 32 A). Für eine bessere Darstellung der transfizierten Zellen der Allokortexbereiche wurden die manipulierten Jungtiere am 21. Tag nach der Geburt (P21, *postpartum*), nach vollständiger Ausbildung der Hippocampusformation, präpariert und analysiert.

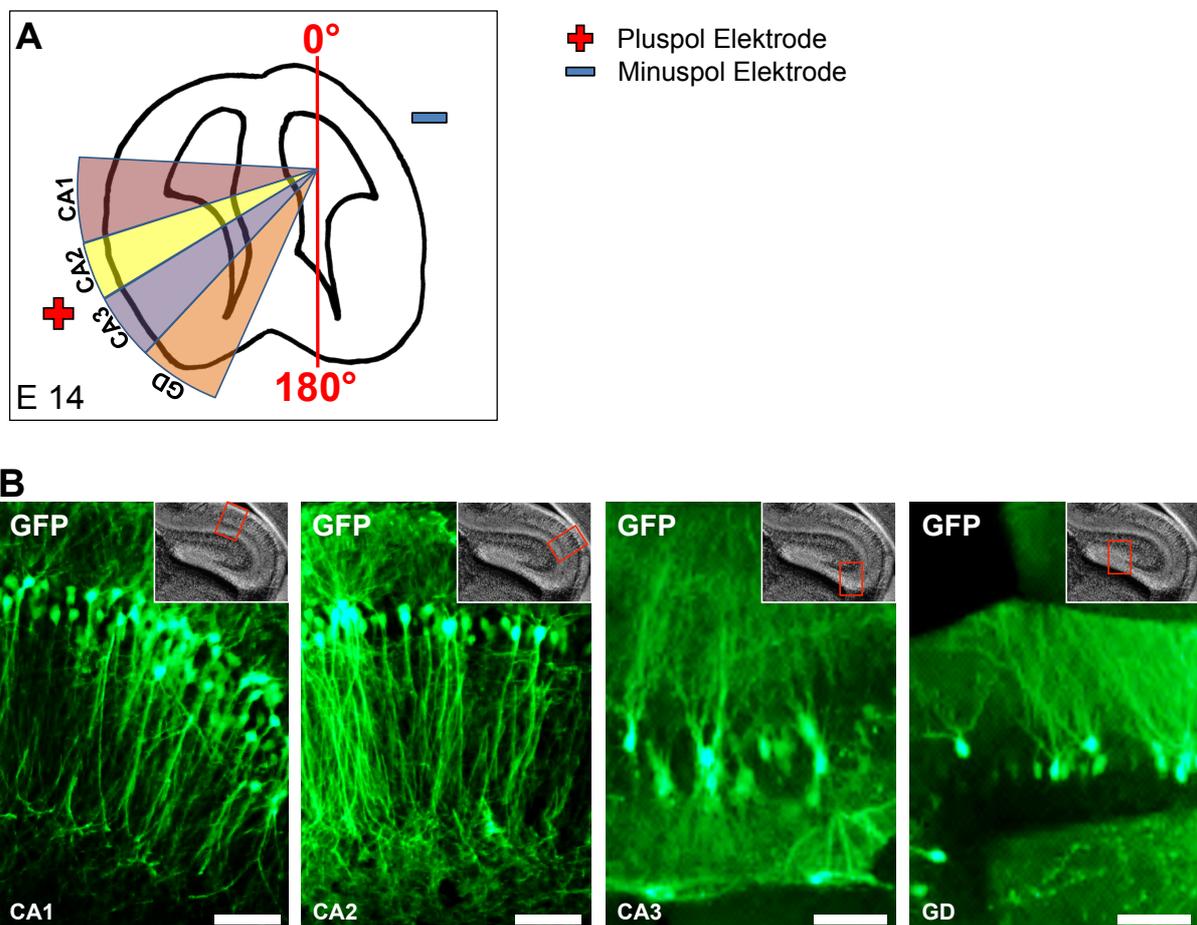


Abbildung 32: Transfektionsstandards zur Manipulation der Hippocampusformation durch die *In-utero*-Elektroporation

(A) Darstellung der Winkel der Pluspol-Elektrode für eine erfolgreiche Transfektion der Bereiche des Ammonshorns (*Cornu ammonis*) CA1-CA3 und des *Gyrus dentatus* (GD) (Grafik der frontalen Ventrikelschnittansicht des murinen Großhirns mit Winkelangaben im Stadium E14, *p.c.*). (B) Fluoreszenzaufnahmen erfolgreich transfizierter, GFP-positiver hippocampaler Neurone in der CA1- (linkes Bild), CA2- (2. Bild von links), CA3-Region (3. Bild von links) und im *Gyrus dentatus* (rechtes Bild) (vergrößerte Aufnahme (Rechteck) aus der Übersichtsaufnahme, Messbalken = 50 Mikrometer, P21).

Die Winkel der Pluspolelektrode wurden durch erfolgreiche Wiederholungen der zellulären Manipulation der Hippocampusformationen ermessend (Abbildung 32 A). Eine erfolgreiche Transfektion konnte bei den manipulierten Jungtieren durch ein positives GFP-Signal, das durch das Plasmid *pCAGGS* codiert war, in den Neuronen nachgewiesen werden.

Die CA1-Region des Ammonshorns wurde mit Winkeln der Pluspolelektrode von 250 bis 275 Grad erfolgreich transfiziert (Abbildung 32 B, linkes Bild). Mit Winkelansätzen der Pluspolelektrode im Verhältnis zur Nullachse von 230 bis 250 Grad wurden Zellen der sich später entwickelnden CA2-Region (Abbildung 32 B, 2. Bild von links) im Winkel von 210 bis 230 Grad von der CA3-Region (Abbildung 32 B, 3. Bild von links) manipuliert. Neuronale Zellen, die im *Gyrus dentatus* vorkommen, können mit Transfektionswinkeln der Elektrode (Pluspol) von 190 bis 210 Grad transfiziert werden (Abbildung 32 B, 4. Bild von links).

D.1.4.3 Thalamus, Hypothalamus, lateraler Septumkern und Striatum

Weiterhin sollten geeignete Transfektionsregionen in zentralnervösen Kernbereichen, wie im lateralen Septumkern, im Striatum, im Thalamus und im Hypothalamus gezielte Transfektionen durchgeführt werden. Aus vielen regionalen Transfektionen wären Migrationsanalysen von Zellen in und aus tieferen Kerngebieten des ZNS möglich (Matsui et al. 2011). Dafür wurden diese Regionen mit GFP-codierenden Plasmiden (*pCAGGS*, Konzentration 4 Mikrogramm je Mikroliter) transfiziert.

Die Winkel des Pluspols der Elektrode für das Striatum wurden von 100 bis 170 Grad und für die Septumkerne von 170 bis 240 Grad gemessen (Abbildung 33 A). Damit weniger fehlerhafte Elektroporationen durch Transfektionen der Hippocampusformation aufgrund der Winkelüberschneidungen entstanden, wurden jüngere Entwicklungsstadien der Embryonen (E12-E14, *p.c.*) für diese Studie eingesetzt.

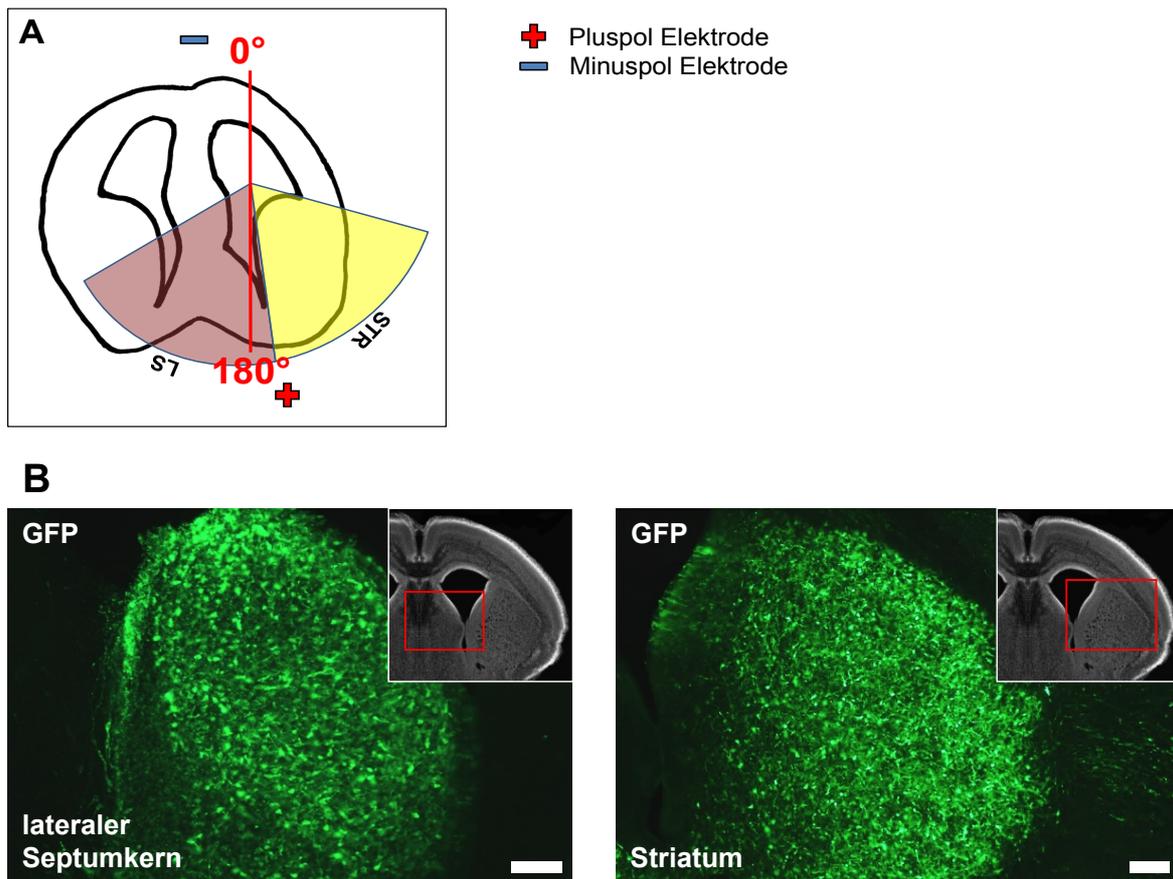


Abbildung 33: Transfektionsstandards zur Manipulation der lateralen Septumkerne und der Striata durch die *In-utero*-Elektroporation

(A) Darstellung der Winkel der Pluspol-Elektrode für eine erfolgreiche Transfektion der Regionen der Septumkerne (LS) und des Striatums (STR). (Grafik der frontalen Ventrikelschnittansicht des murinen Großhirns mit Winkelangaben im Stadium E14, *p.c.*). (B) Fluoreszenzaufnahmen erfolgreich transfizierter GFP-positiver Zellen in den Bereichen der septalen Kerne und des Striatums (vergrößerte Aufnahme (Rechteck) aus der Übersichtsaufnahme, Messbalken = 100 Mikrometer, E18).

Die Transfektionen des lateralen Septumkerns und des Striatums mittels *In-utero*-Elektroporation führten mit den angewendeten Winkeln zu GFP-positiven Zellen in diesem Bereich (Abbildung 33 A). Bei einem Winkel des Pluspols von 170 bis 240 Grad zur Nullachse konnten erfolgreich Zellen des lateralen Septumkerns transfiziert werden (Abbildung 33 B, linkes Bild). Zellen des Striatums ließen sich mit großer Effizienz mit einem Pluspolelektrodenwinkel von 100 bis 170 Grad manipulieren (Abbildung 33 B, rechtes Bild).

Für die *In-utero*-Elektroporationen der Thalamus- und Hypothalamuskern wurden Embryonalstadien von E12 bis E13 (*p.c.*) transfiziert. Nach Injektion der Plasmide (*pCAGGS*, Konzentration 4-8 Mikrogramm je Mikroliter) in die lateralen Ventrikel wurde nach einem Zeitintervall von 2-3 Minuten die Elektroporation durchgeführt. Durch diese Wartezeit verteilten sich die Plasmide über das gesamte Ventrikelsystem und es konnte mit einem Winkel des Pluspols von 25 bis 40 Grad der Thalamus- und mit einem Winkel von 90 bis 180 Grad der Hypothalamus über den 3. Ventrikel transfiziert werden (Abbildung 34 A).

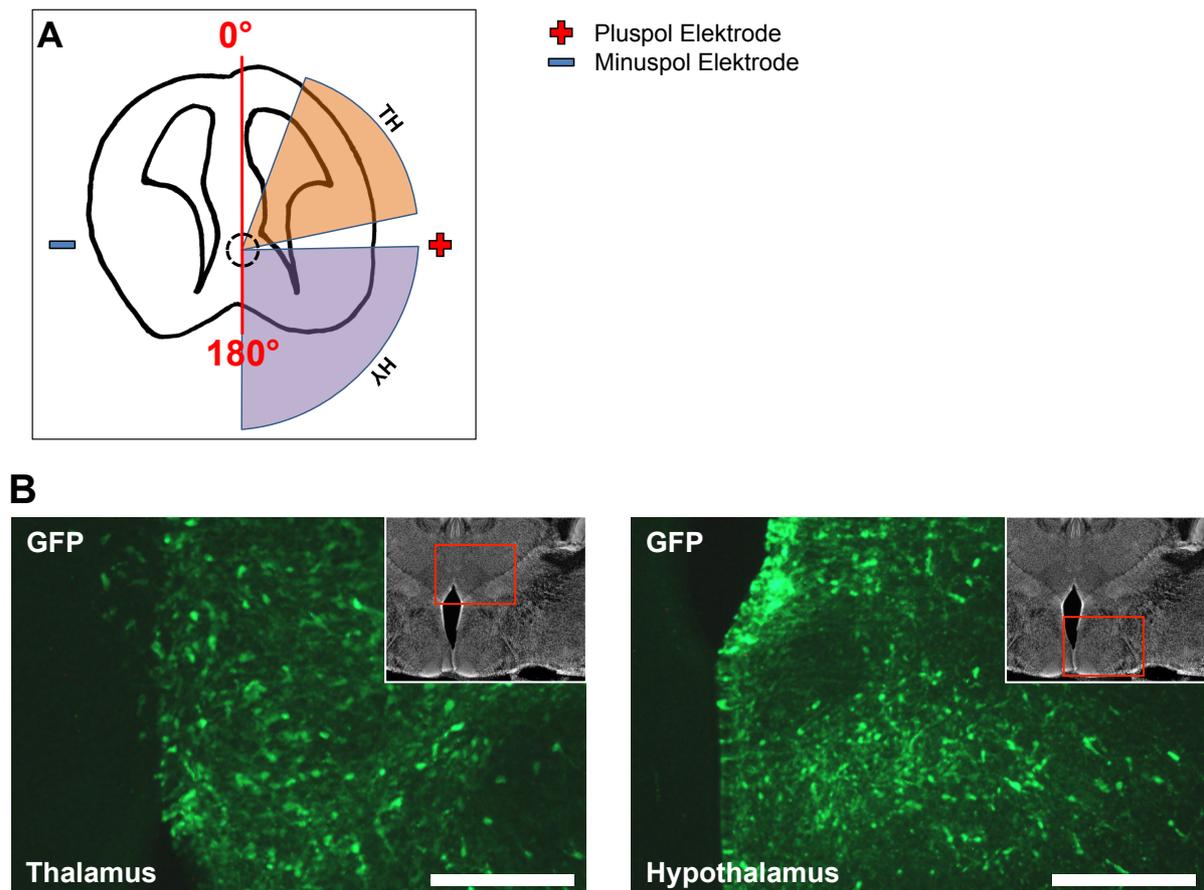


Abbildung 34: Transfektionsstandards zur Manipulation des Thalamus und des Hypothalamus durch die *In-utero*-Elektroporation

(A) Darstellung der Winkel der Pluspol-Elektrode bezogen auf den Ausgangspunkt des 3. Ventrikels für eine erfolgreiche Transfektion des Thalamus (TH) und des Hypothalamus (HY) (Grafik der frontalen Schnittansicht des murinen Großhirns mit Winkelangaben im Stadium E14, *p.c.*). (B) Fluoreszenzaufnahmen erfolgreich transfizierter GFP-positiver Zellen im Bereich des Thalamus und Hypothalamus (vergrößerte Aufnahme (Rechteck) aus der Übersichtsaufnahme, Messbalken = 100 Mikrometer, E18).

Die hier erstellten Winkelvorgaben des Pluspols der anzusetzenden Elektrode führten zu erfolgreichen Transfektionen der tieferen Kerne, hier Bereiche des Thalamus und Hypothalamus (Abbildung 34 A). Durch die zeitlich verzögerte Elektroporation nach erfolgter Injektion konnten die GFP-codierenden Plasmide in das Lumen des 3. Ventrikels diffundieren. In diesem Bereich der sich entwickelnden Großhirnanlage befinden sich u. a. die Vorläuferzellen der späteren Thalamus- und Hypothalamuskern. Mit einem Winkelansatz der Elektrode (Pluspol) von 25 bis 40 Grad konnten gezielt Vorläuferzellen des sich entwickelnden Thalamus transfiziert werden (Abbildung 34 B, linkes Bild). In einem Winkel von 90 bis 180 Grad gelang dies mit Zellen, die im späteren Hypothalamus vorkamen (Abbildung 34 B, rechtes Bild).

D.1.4.4 Transfektion neuronaler Zellen mit ihren Projektionen

Projektionen wie z. B. der Gehirnbalken (*Corpus callosum*, CC), die ventrale hippocampale Kommissur, der laterale migratorische Strom oder die vordere Kommissur (*Commissura anterior*, VK) könnten mithilfe der *In-utero*-Elektroporation manipuliert werden. Dadurch ließe sich z. B. die Entwicklung neuronaler Netzwerke und Kerngebiete im ZNS studieren.

Im Folgenden sollte die Möglichkeit untersucht werden, ob manipulierte Zellen, die weite Migrationswege hatten, anhand ihres GFP-Signals in ihren Zellausläufern nachverfolgt werden könnten. Dazu wurden Embryonen im Alter von 12 bis 15 Tage (E12-E15, *p.c.*) mit Plasmiden (*pCAGGS*, Konzentration 10-15 Mikrogramm) transfiziert. Es wurden für die Projektionen im Gehirnbalken (*Corpus callosum*) Transfektionswinkel der Elektrode des motorischen und somatosensorischen Kortex ausgetestet (Abbildung 31 A, 0-95 Grad). Für Darstellungen des lateralen migratorischen Stroms und für die vordere Kommissur (*Commissura anterior*) wurden Elektrodenwinkel (Pluspol) der Transfektion des somatosensorischen und piriformen Kortex angewendet (Abbildung 31 A, 40-110 Grad). Die Zellausläufer der ventralen hippocampalen Kommissur wurden durch Transfektionswinkel, die bei der hippocampalen CA1-Elektroporation angewendet wurden, dargestellt (Abbildung 32 A, 250-275 Grad).

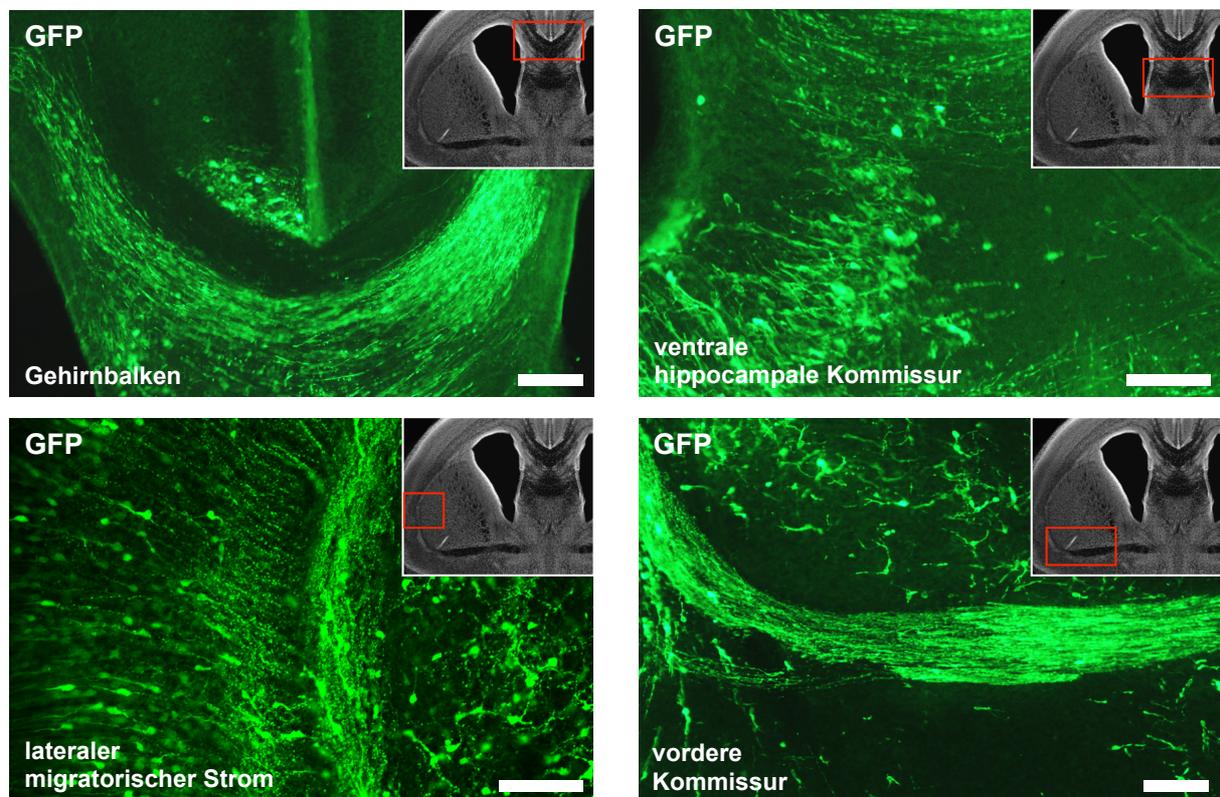


Abbildung 35: Fluoreszenzaufnahmen von Projektionen nach erfolgreicher *In-utero*-Elektroporation

Transfektionen von Zellen des motorischen und somatosensorischen Kortex führten zur Möglichkeit der Darstellung ihrer Projektionen im Gehirnbalken (*Corpus callosum*, Bild oben links). Fluoreszierende Zellausläufer der ventralen hippocampalen Kommissur konnten nach Transfektionen der hippocampalen CA1-Region nachgewie-

sen werden (Bild oben rechts). Mit Zelltransfektionen des somatosensorischen und piriformen Kortexareals konnten Zellausläufer im lateralen migratorischen Strom und der vorderen Kommissur (*Commissura anterior*) dargestellt werden (Bild unten links und rechts, vergrößerte Aufnahme (Rechteck) aus der Übersichtsaufnahme, Messbalken = 100 Mikrometer, E18)

Mit gezielten Transfektionen projizierender Zellen konnten ihre zellulären Ausläufer und die damit verbundenen Migrationswege im zentralen Nervensystem dargestellt werden. Projektionen im Gehirnbalken konnten mit Transfektionen des sich entwickelnden motorischen und somatosensorischen Kortexbereiches gezeigt werden (Abbildung 35, Bild oben links). Bei eingesetzten Elektrodenwinkeln (Pluspol) von 250 bis 275 Grad im Verhältnis zur Nullachse (entspricht der Transfektion der CA1-Region der Hippocampusformation) konnten GFP-positive Zellausläufer in der ventralen hippocampalen Kommissur gefunden werden (Abbildung 35, Bild oben rechts). 3-4 Tage nach Transfektion im Bereich des entstehenden somatosensorischen und piriformen Kortexareals stellten sich GFP-positive Projektionen im lateralen migratorischen Strom und in der vorderen Kommissur (*Commissura anterior*) dar (Abbildung 35, Bild unten links und rechts).

D.1.5 Transfektion kortikaler Bereiche des dorsolateralen Großhirns

Nachdem die Transfektion kortikaler Großhirnbereiche etabliert werden konnte (Abschnitt D.1.4.1), wurde in diesem Abschnitt der Arbeit ein Standardverfahren zur quantitativen Analyse radialer Migrationsphänomene neuronaler Zellen im somatosensorischen Kortexbereich mithilfe der *In-utero*-Elektroporationstechnik entwickelt. Es sollten Auswirkungen einer Plasmidtransfektion auf das radiale, migratorische Verhalten in Abhängigkeit von den elektroporierten Embryonalstadien untersucht werden. Dafür wurden 2 Auswertemöglichkeiten (objektive und subjektive Analyse) miteinander verglichen.

In der objektiven Studie wurden Histogramme der fluoreszierenden Proteine (Fluoreszenzintensität), die nach Transfektion der codierenden Plasmide in den Zellen exprimierten, erstellt (nachfolgend Abschnitt D.1.5.1).

Die subjektive Analyse umfasst die visuelle Auszählung der transfizierten Zellen in den kortikalen Großhirnbereichen, gestützt durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (nachfolgend Abschnitt D.1.5.2).

Für diese beiden Versuchsreihen wurden Embryonen zwischen den frühesten (E12, *p.c.*) und den spätesten (E17, *p.c.*) möglichen Embryonalstadien für eine *In-utero*-Elektroporation untersucht. Es wurden dafür Plasmide, die nur GFP codierten, über den lateralen Ventrikel im Kortex der Großhirnanlage transfiziert. Am 18. Trächtigkeitstag (E18, *p.c.*) erfolgten die

Präparation und die Fixierung der Embryonengehirne und ihre immunhistologische Aufarbeitung. Es wurden in diesen Studien nur Schnitte vom Gehirn berücksichtigt, bei denen eine erfolgreiche Transfektion des somatosensorischen Kortexbereiches nachgewiesen werden konnte (Abbildung 36).

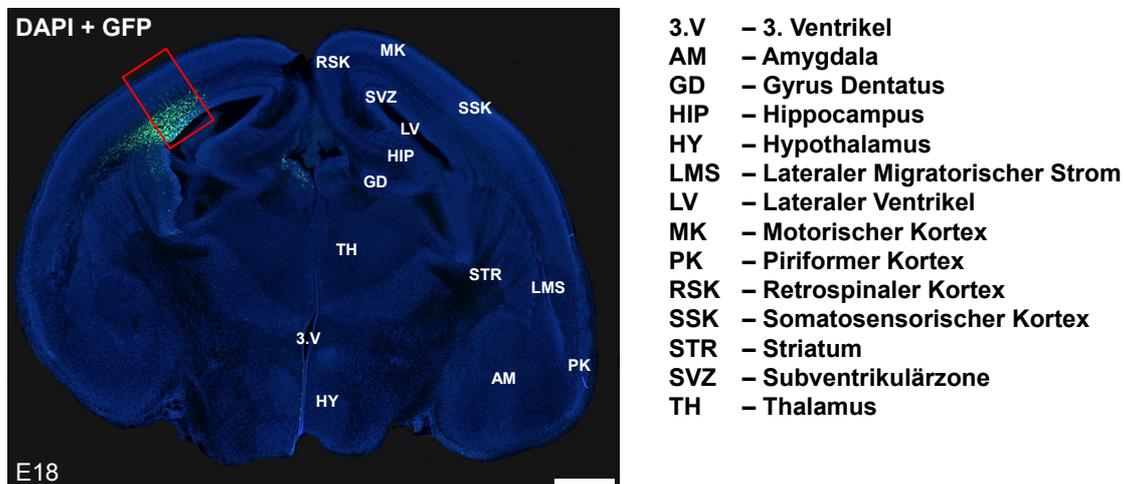


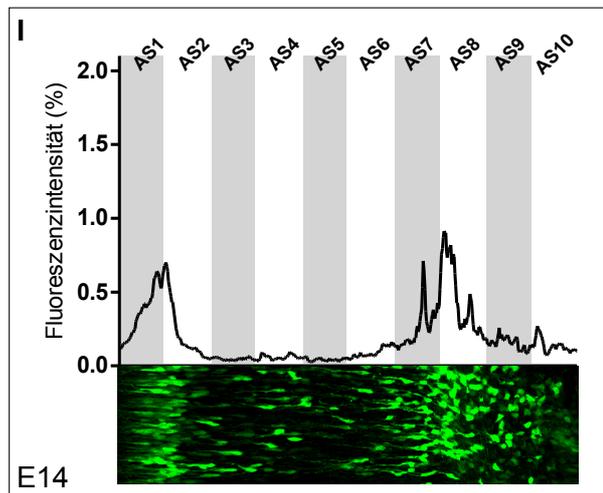
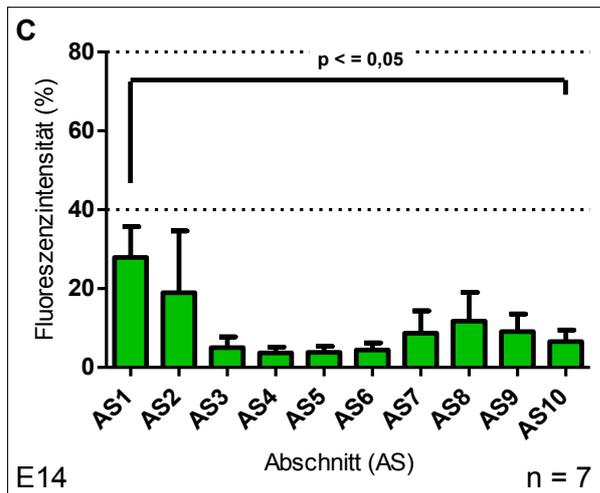
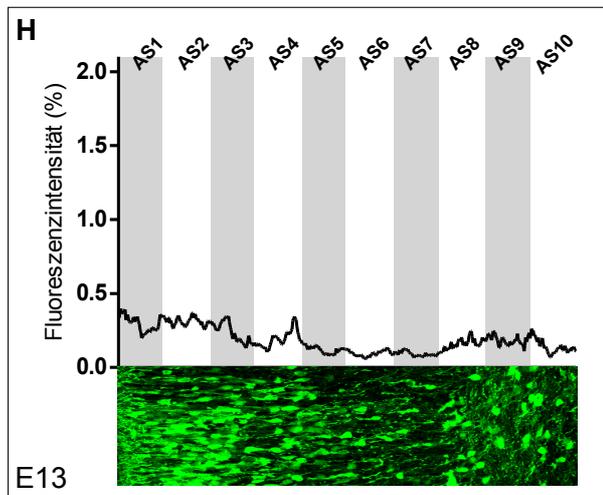
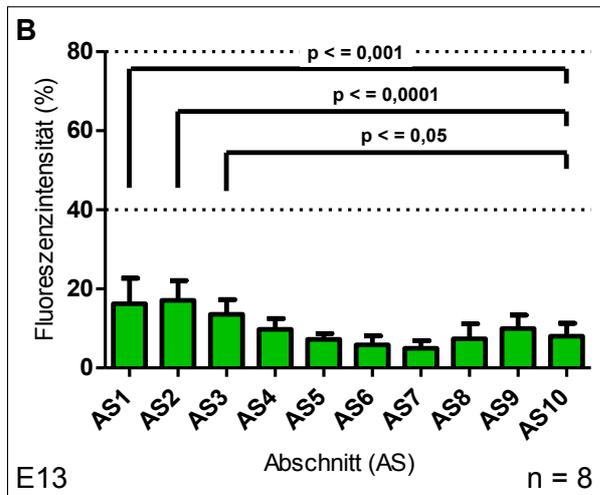
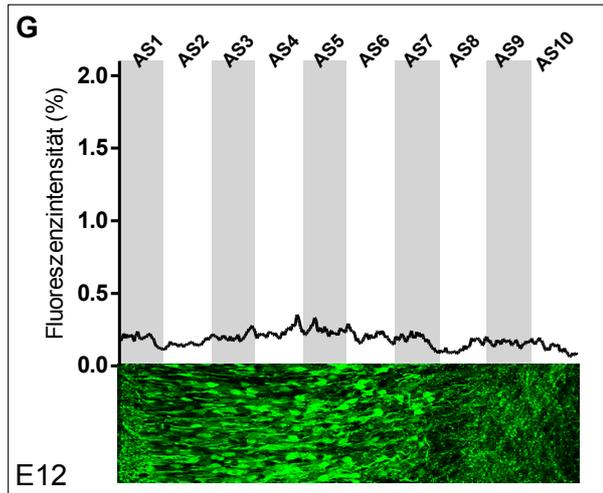
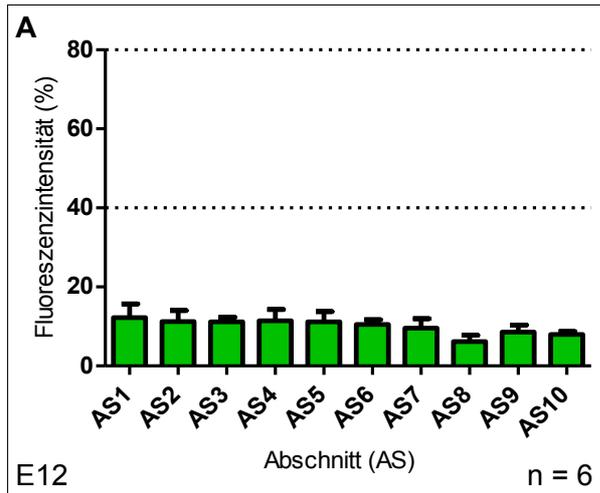
Abbildung 36: Radiale Migrationsanalyse durch Plasmidtransfektionen von neuronalen Vorläuferzellen des somatosensorischen Kortexareals

Das Bild stellt ein Beispiel einer Transfektion von E15 bis E18 (*p.c.*) im somatosensorischen Kortex eines C57BL/6-Mausembryos dar. Aus diesem Bereich (Rechteck) wurden die Histogramme gemessen (Abschnitt D.1.5.1) und die Zellauszählungen (Abschnitt D.1.5.2) durchgeführt (Messbalken = 500 Mikrometer).

Damit eine Vergleichbarkeit zwischen der Histogrammberechnung (Abschnitt D.1.5.1) und der Zellauszählung (Abschnitt D.1.5.2) möglich war, wurden die gleichen Gewebeausschnitte jeder Transfektion für beide Analyseverfahren ausgewertet. Die Zell- oder Fluoreszenzverteilung in den 10 Abschnitten (Abbildung 10) in Abhängigkeit des Transfektionsstadiums gibt Aufschluss über die radiale Migration der neuronalen Zellen.

D.1.5.1 Quantitatives Auswerteverfahren mit Histogrammberechnungen

Für die objektive Analyse wurden jeweils 2 x 200 Mikrometer breite Histogramme aus den Schnittbildern transfizierter somatosensorischer Kortexbereiche erstellt (Abbildung 37, G-L). Mit dem Auswerteprogramm MetaMorph® (Version 7.7.3, Sunnyvale, Kalifornien, USA) erfolgte, wie unter Abschnitt C.3.4.4 beschrieben, die Mittelwertberechnung der detektierten Fluoreszenzen der einzelnen Abschnitte (Abbildung 37, A-H). Durch die Vorgabe des Volumens (2 Mikroliter) und der Konzentration (4 Mikrogramm je Mikroliter) der injizierten Plasmide konnte die Transfektion der Vorläuferzellen im Abschnitt 10 verhältnismäßig gleich vorgegeben werden. Aus diesem Grund wurde dieser Abschnitt als Referenz für die statistische Auswertung der anderen 9 Abschnitte verwendet.



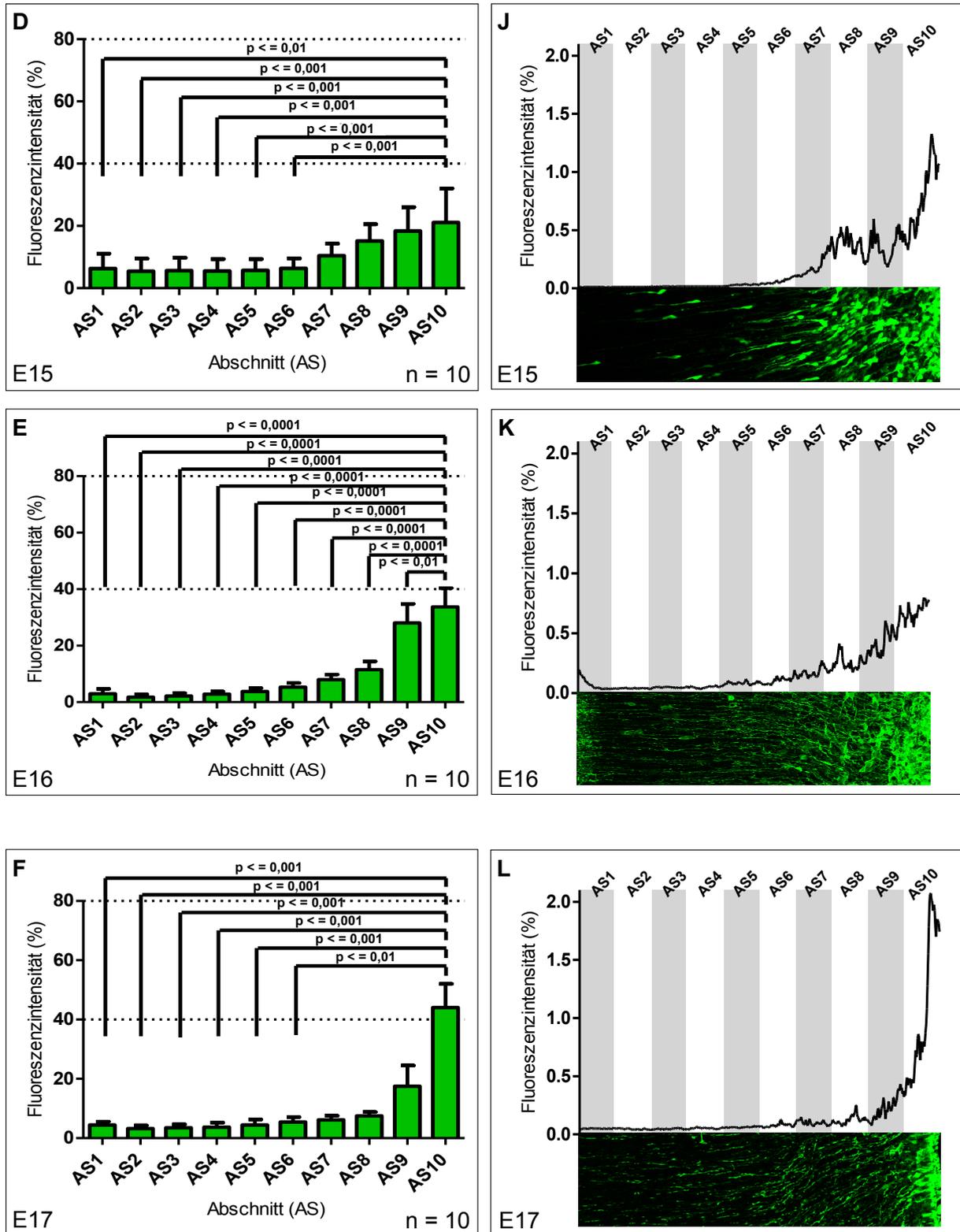


Abbildung 37: Histogrammauswertungen kortikaler Transfektionen im Großhirnbereich der Embryonalstadien E12-E17 (p.c.)

Die linken Abbildungen (A-F) zeigen die Zusammenfassung der Berechnungen aller gemessenen Histogramme der einzelnen Embryonalstadien. Auf der rechten Seite (G-L) sind exemplarisch Histogrammbeispiele der 200 Mikrometer breiten Fluoreszenzaufnahmen der einzelnen Embryonalstadien dargestellt (AS = Abschnitt, E = Embryonalstadium, (A), (C), (D) und (F): Kruskal-Wallis-Test, Post-hoc-Test Dunns-Korrektur, (B) und (E): ANOVA, Post-hoc-Test Bonferroni-Korrektur, Mittelwert mit SD, Höhe der Bildausschnitte rechts unter Histogrammbeispiele = 200 Mikrometer, alle nicht dargestellten Vergleiche zwischen AS10 und AS1 bis AS9 waren nicht signifi-

kant: $p > 0,5$, p = Signifikanzwert, E = Embryonalstadium bei Transfektion, n = Anzahl transfizierter Embryonen je Embryonalstadium).

Bei Transfektionen im Embryonalstadium E12 verteilte sich die Anzahl der Fluoreszenzsignale über alle Abschnitte annähernd gleich und es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen Abschnitt 10 und den anderen 9 (Abbildung 37 A und G, Kruskal-Wallis-Test, Post-hoc-Test Dunns-Korrektur, $n = 6$).

Bei Transfektionen ab E13 kam es zu einer signifikanten Verschiebung der Fluoreszenzsignale in den Histogrammen. Die Abschnitte 1-3 waren im Vergleich zum Abschnitt 10 signifikant in der Anzahl fluoreszierender Proteine erhöht. Die Abschnitte 5-8 zeigten die niedrigsten messbaren Fluoreszenzsignale (Abbildung 37 B und H, ANOVA, Post-hoc-Test Bonferroni-Korrektur, $n = 8$).

Der beschriebene Trend bei E13 konnte auch bei Transfektionen im Stadium E14 der Embryonalentwicklung festgestellt werden. Zwischen Abschnitt 3 bis 6 lagen die geringsten messbaren fluoreszierenden Pixel. Abschnitt 1 hatte bei Transfektionen in diesem Stadium einen signifikant höheren Unterschied in der GFP-Pixelanzahl im Vergleich zu Abschnitt 10 (Abbildung 37 C und I, Kruskal-Wallis-Test, Post-hoc-Test Dunns-Korrektur, $n = 7$).

Transfektionen in höheren Entwicklungsstadien ab E15 wiesen ein anderes Histogrammbild auf. Die messbaren Fluoreszenzsignale stiegen von Abschnitt 1 bis 10 tendenziell an. Es wurden verstärkt Signale der grünen Fluoreszenz in den Abschnitten 7-10 bei Transfektionen mit E15 gemessen. Die Abschnitte 1-6 hatten signifikante, um ein Drittel niedrigere Werte in den Histogrammen im Vergleich zu Abschnitt 10 (Abbildung 37 D und J, Kruskal-Wallis-Test, Post-hoc-Test Dunns-Korrektur, $n = 10$).

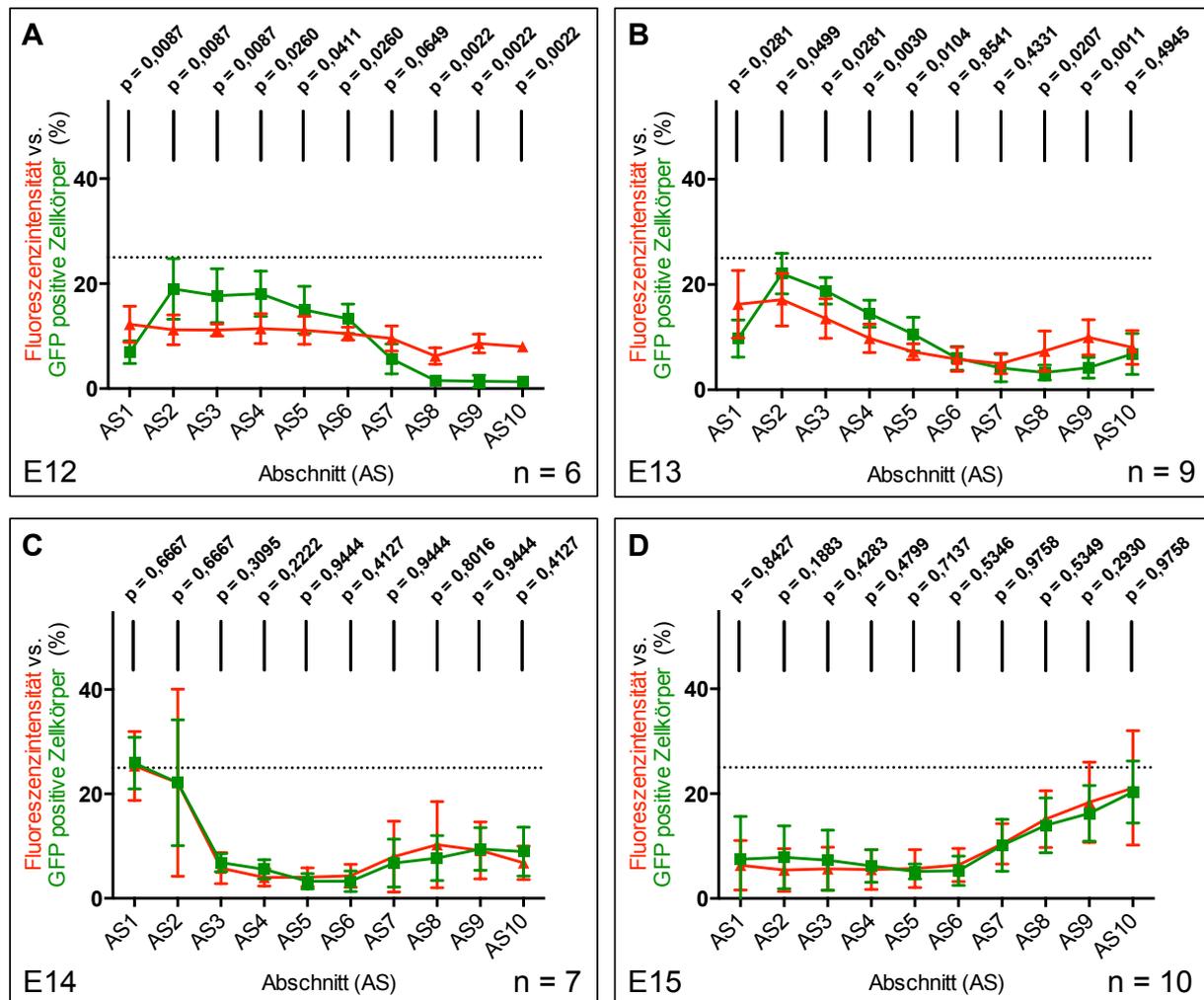
Manipulationen mit der *In-utero*-Elektroporation im Entwicklungsstadium E16 zeigten niedrigere signifikante Werte zwischen den Abschnitten 1 bis 9 im Vergleich zum Abschnitt 10 in den gemessenen GFP-Signalen der Histogrammanalysen. Mehr als 60 Prozent aller grünen Fluoreszenzsignale wurden in Abschnitt 9 und 10 gemessen (Abbildung 37 E und K, ANOVA, Post-hoc-Test Bonferroni-Korrektur, $n = 10$).

Die Analysen der im ältesten Stadium durchgeführten Transfektionen (E17) wiesen ebenfalls eine mehr als 60-prozentige Dominanz aller grün fluoreszierenden Signale in Abschnitt 9 und 10 auf. Es konnte der Trend festgestellt werden, dass Abschnitt 10 die meisten fluoreszierenden Pixel beinhaltete. In den Abschnitten 1-6 waren die Fluoreszenzsignale signifikant geringer als im Abschnitt 10. Abschnitt 7 und 8 zeigten keinen signifikanten Unterschied in der prozentualen Verteilungsberechnung der Fluoreszenzsignale zum Abschnitt 10. Es konn-

te jedoch ein Trend zu einer schwächeren Fluoreszenz festgestellt werden (Abbildung 37 F und L, Kruskal-Wallis-Test, Post-hoc-Test Dunns-Korrektur, n = 10).

D.1.5.2 Quantitatives Auswerteverfahren durch Zellkörperauszählungen

In den Histogrammberechnungen wurden Ausläufer von transfizierten Zellen, die anhand des grün fluoreszierenden Proteins detektiert wurden, mit einberechnet. Aus diesem Grund sollten in dieser 2. Analyse nur die GFP-positiven Zellkörper gezählt werden. Es wurden pro Abschnitt (AS) die GFP-positiven, grün fluoreszierenden Zellkörper mithilfe des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (Leica TCS SL, Bensheim, Germany) erfasst und ihr prozentualer Anteil mit allen gezählten transfizierter Zellen im Messbereich wurde berechnet (Anhang 2). Diese Daten wurden mit den Histogrammauswertungen aus Abschnitt D.1.5.1 vergleichend dargestellt (Abbildung 38 A-F).



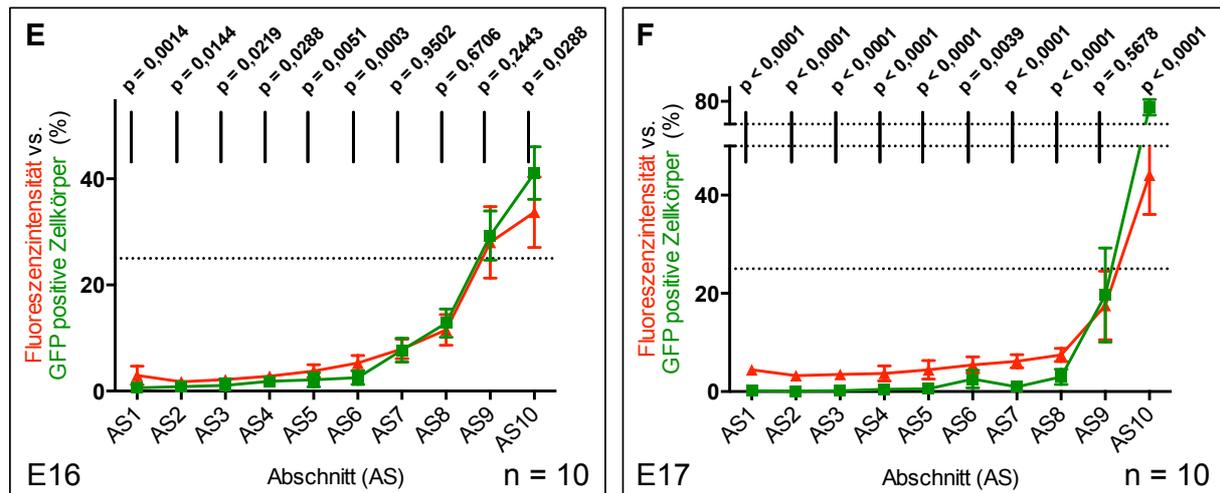


Abbildung 38: Quantitative Auszählung transfizierter, GFP-positiver Zellkörper im Vergleich zur Histogrammanalyse aus Abschnitt D.1.5.1

Transfektionen der jungen Stadien ((A) E12 und (B) E13) zeigten in den prozentualen Verteilungen innerhalb der 10 Abschnitte eine deutliche Differenzierung zwischen den objektiven und den subjektiven Auswertungsergebnissen. Aus den Vergleichen beider Transfektionsanalysen ergab sich, dass nur bei *in-utero*-Elektroporationen von 14 und 15 Tage alten Embryonen ((C) E14 und (D) E15, *p.c.*) kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Auswerteverfahren existierte. Die älteren transfizierten Stadien ((E) E16 und (F) E17) zeigten im Vergleich zwischen beiden Analyseverfahren ähnliche prozentuale Verteilungen innerhalb der Abschnittseinteilung, waren aber zum Großteil signifikant voneinander zu unterscheiden (AS = Abschnitt, E = Embryonalstadium bei Transfektion, Mittelwert mit SD, für den statistischen Vergleich beider Analyseverfahren wurden die einzelnen Abschnitte untereinander mit dem Mann-Whitney-Test berechnet, p = Signifikanzwert, n = Anzahl transfizierter Embryonen je Embryonalstadium).

Die vergleichende Auswertung der prozentualen Verteilung der GFP-positiven Zellkörperauszählungen und der berechneten Histogrammauswertungen der Fluoreszenzintensitäten zeigte bei Transfektionen mit Embryonalstadium 12 (E12, *p.c.*) deutliche Unterschiede innerhalb der eingeteilten 10 Abschnitte des dorsolateralen Großhirns. Die Datenauswertung der Histogrammberechnungen ergab, dass bei E12-Transfektionen eine annähernd gleichbleibende Verteilung der Fluoreszenzintensitäten zwischen den Abschnitten 1 bis 10 vorkam (siehe Abschnitt D.1.5.1). Die entsprechenden Zellkörperauszählungen (GFP-positiv) dieser Regionen wiesen in den Abschnitten 1, 8, 9 und 10 eine signifikant geringere und in den Abschnitten 2-5 eine signifikant höhere prozentuale Verteilung vergleichend zur Histogrammanalyse auf. Nur Abschnitt 7 hatte zwischen beiden Analyseverfahren keinen signifikanten Unterschied in der prozentualen Verteilung (Abbildung 38 A, Mann-Whitney-Test, p = Signifikanzwert, n = 6).

5 Tage nach Transfektion (IUE E13-E18, *p.c.*) wurden in der Vergleichsanalyse zwischen Histogrammberechnungen und Zellkörperauszählungen in den Abschnitten 1, 8 und 9 prozentual mehr GFP-positiv Zellkörper gezählt. Die Fluoreszenzintensitätsmessungen dagegen hatten in den Abschnitten 2-5 einen signifikant höheren prozentualen Anteil. In den Ab-

schnitten 6, 7 und 10 wurde kein Unterschied in der prozentualen Verteilung zwischen den Histogrammberechnungen und den Zellkörperauszählungen festgestellt (Abbildung 38 B, Mann-Whitney-Test, $p =$ Signifikanzwert, $n = 9$).

Transfektionen ab Embryonalstadium E14 (*p.c.*) und E15 (*p.c.*) lieferten mit beiden Analyseverfahren gleiche Ergebnisse in der prozentualen Verteilung in allen 10 Abschnitten des Messbereichs (Abbildung 38 C, IUE mit E14, Mann-Whitney-Test, $n = 7$; Abbildung 38 D, IUE mit E15, Mann-Whitney-Test, $n = 10$, $p =$ Signifikanzwert)

In-utero-Elektroporationen von GFP-codierenden Plasmiden im 16. Embryonalstadium (E16, *p.c.*) zeigten 2 Tage nach Transfektion (E18, *p.c.*) eine ähnliche prozentuale Verteilung in der Fluoreszenzintensitätsmessung und in der Zellauszählung im somatosensorischen Kortexbereich. Vergleiche beider Analyseverfahren in den einzelnen Abschnitten ergaben, dass der Nachweis GFP-positiver Zellen in den Abschnitten 1-6 geringer war, als durch die GFP-Fluoreszenzintensitätsmessung berechnet werden konnte. Im Abschnitt 10 wurden mehr GFP-positive Zellen im Vergleich zur Histogrammberechnung ausgewertet. In den Abschnitten 7-9 gab es keine signifikanten Unterschiede beider Auswertungsstrategien (Abbildung 38 E, Mann-Whitney-Test, $p =$ Signifikanzwert, $n = 10$).

Die Analyse von Transfektionen im Embryonalstadium 17 (E17, *p.c.*) zeigte in den Abschnitten 9 und 10 eine prozentuale Dominanz aller ausgewerteten GFP-positiven Zellkörper und GFP-positiven Fluoreszenzsignale. Prozentual gab es mehr GFP-positive Signale in den Abschnitten 1-8 als erkennbare GFP-positive Zellen. Der 9. Abschnitt war nicht signifikant zwischen beiden Auswertungen. Die in Abschnitt 10 prozentual berechneten GFP-positiven Zellen ergaben einen doppelt so hohen Wert im Vergleich zur Histogrammauswertung (Abbildung 38 F, Mann-Whitney-Test, $p =$ Signifikanzwert, $n = 10$).

D.2 Einfluss von PRG-1 auf die neuronale Migration

Die in der Etablierungsphase gewonnenen Erkenntnisse der *In-utero*-Elektroporationstechnik kamen bei den hier gezeigten Forschungen zur Anwendung. Es sollte der Einfluss des neuronalen membranständigen Proteins PRG-1 auf das Migrationsverhalten kortikaler Neurone während der embryonalen Entwicklung untersucht werden.

Für diese Experimente wurden neuronale Vorläuferzellen im sich entwickelnden somatosensorischen Kortex der Großhirnanlage transfiziert. Es ist aus vorangegangenen Studien bekannt, dass ab dieser Entwicklungsphase die natürliche Expression von PRG-1 in dieser Hirnregion nachweisbar ist (siehe Abschnitt B.4.1). Für die Analysen wurden *In-utero*-Elek-

troportionen an 15 Tage alten Embryonen (E15, *p.c.*) durchgeführt. Dieses Stadium eignet sich besonders für kortikale Migrationsstudien, da im letzten Viertel der murinen Embryonalentwicklung Neurone mit langen radialen Migrationswegen aus neuronalen Vorläuferzellen geboren werden (Rakic 1995). Aufgrund der unter Abschnitt D.1.5.2 gewonnenen Daten wurde für Untersuchungen migratorischer Phänomene im dorsolateralen Großhirn die objektive Analyse durch Histogrammberechnung der GFP-positiven Fluoreszenzsignale (Auswerteprogramm MetaMorph®, Version 7.7.3, Sunnyvale, Kalifornien, USA) vorgezogen. Die Fixierung und Präparation der Mausgehirne erfolgte im Embryonalstadium E18,5-19 (*p.c.*).

D.2.1 Einfluss einer PRG-1-Überexpression im kortikalen PRG-1-wt-Großhirn

In dieser Studie sollte ein möglicher Einfluss einer Überexpression des Proteins PRG-1 untersucht werden. Dazu wurden 15 Tage alte Embryonen (Wildtypiere) mit PRG-1-codierenden Plasmiden transfiziert (*pCAG-mPRG1(FLAG)*). Zur Kontrolle wurden Embryonen des gleichen Entwicklungsstadiums mit dem Plasmid *pCAG*, das keine PRG-1-Sequenz enthielt, transfiziert. Beide Plasmide exprimieren in positiv transfizierten Zellen das grün fluoreszierende Protein (GFP). Somit konnten transfizierte Zellen mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie bestimmt werden (Abbildung 39 A). Die Auswertung der prozentualen Verteilung der grünen Fluoreszenz in den zu untersuchenden Kortexbereichen erfolgte durch Histogrammberechnungen (Abbildung 39 B).

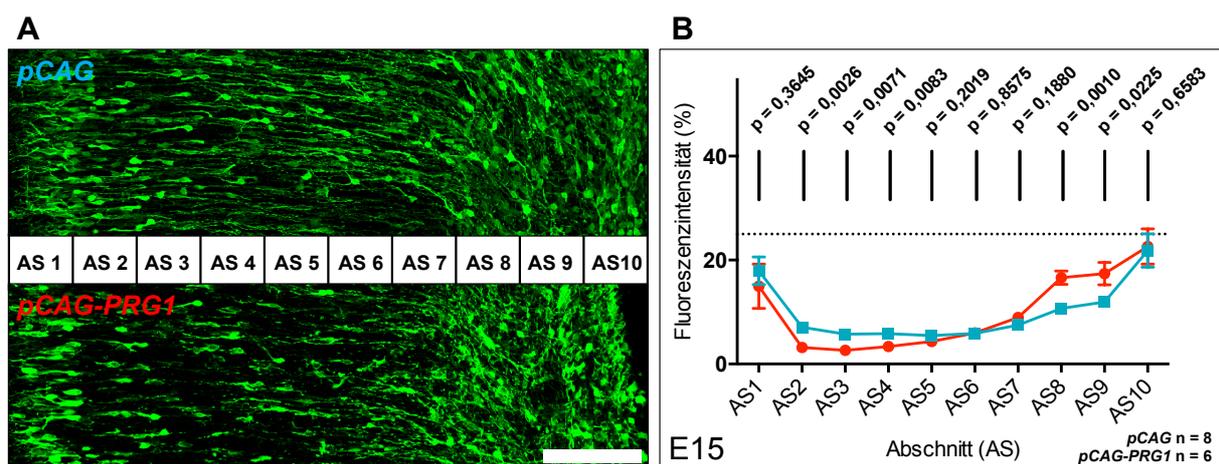


Abbildung 39: Untersuchung der Überexpression des Proteins PRG-1 auf die neuronale Migration im somatosensorischen Kortex der Großhirnanlage

(A) zeigt Beispielaufnahmen gemessener Bereiche des somatosensorischen Kortex und die Abschnittseinteilung zur Histogrammanalyse (oberes Bild die Kontrolle durch *pCAG*-Transfektionen, unten die Überexpression mit *pCAG-mPRG1(FLAG)*, Messbalken = 200 Mikrometer). (B) Transfektion des Plasmids *pCAG-mPRG1(FLAG)* in PRG-1-wt-Embryonen zeigten signifikant niedrige Werte in der prozentualen Verteilung transfizierter Zellen in den Bereichen der kortikalen Platte (Abschnitte 2-4) im Vergleich zu den Kontrollen. Im Übergang der subventrikulären

ren Zone zur Intermediärzone (AS8 und AS9) waren dagegen mehr PRG-1-überexprimierende Zellen zu finden (blau: Kontrolle, rot: PRG-1-Überexpression, E18,5 *p.c.*, AS = Abschnitt, Mittelwert mit SD, für den statistischen Vergleich zwischen Kontrolle und Überexpression wurden die einzelnen Abschnitte untereinander mit dem Mann-Whitney-Test berechnet, *pCAG* n = 8 und *pCAG-mPRG1(FLAG)* n = 6 transfizierte Embryonen, E = Embryonalstadium bei Transfektion, p = Signifikanzwert).

Die Überexpression von PRG-1 durch Zelltransfektionen im somatosensorischen Kortex zeigte im Vergleich zur Kontrolle in Bereichen der kortikalen Platte und in der Übergangszone zwischen Intermediär- und Subventrikulärzone signifikante Unterschiede in der prozentualen Verteilung der Fluoreszenzsignale. So wurden in den Abschnitten 2-4 weniger Fluoreszenzen in PRG-1-überexprimierenden Geweben gefunden (Abbildung 39 B, Mann-Whitney-Test). In den Abschnitten 8 und 9 der Kontrolltransfektionen waren die prozentualen Verteilungen der Fluoreszenzsignale signifikant niedriger (Abbildung 39 B, Mann-Whitney-Test). Die Abschnitte 1, 5-7 und 10 zeigten in der Analyse der Histogrammauswertungen keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Transfektionen (PRG-1 und Kontrolle) (Abbildung 39 B, Mann-Whitney-Test, Kontrolle: n = 8 und *pCAG-mPRG1(FLAG)* n = 6 transfizierte Embryonen, p = Signifikanzwert).

D.2.2 Einfluss einer PRG-1-Überexpression im kortikalen

PRG-1-ko-Großhirn

Nachdem die Überexpression von PRG-1 in PRG-1-wt-Embryonen (PRG-1-Wildtypiere) Unterschiede in der prozentualen Verteilung der transfizierten Fluoreszenzproteine innerhalb des kortikalen Aufbaus zur Folge hatte, wurde mit den nachfolgenden *In-utero*-Elektroporationsversuchen der Einfluss von PRG-1 in PRG-1-ko-Tieren getestet. Die transfizierten Zellen der PRG-1-defizienten Embryonen exprimierten nach der IUE PRG-1. Es wurden Kontrolltransfektionen mit dem Plasmid *pCAG* in gleichaltrige PRG-1-ko-Embryonen durchgeführt (Abbildung 40 A). Beide Plasmidtransfektionen wurden statistisch ausgewertet und miteinander verglichen (Abbildung 40 B).

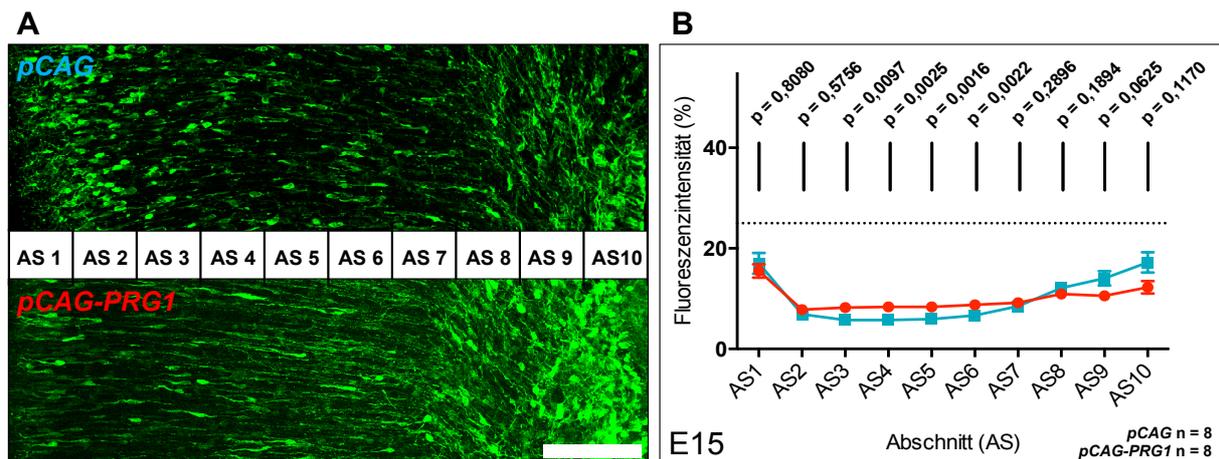


Abbildung 40: Studie zur neuronalen Migration PRG-1-transfizierter, somatosensorischer Kortexareale in PRG-1-defizienten Embryonen

(A) Beispielaufnahmen transfizierter dorsolateraler Kortexausschnitte, die mit Kontroll- (*pCAG*, Bild oben) und PRG-1-codierenden (*pCAG-PRG-1(FLAG)*, Bild unten) Plasmiden manipuliert wurden (Messbalken = 100 Mikrometer). (B) im Vergleich beider Transfektionen ergab sich, dass statistisch mehr Fluoreszenzsignale durch PRG-1-Transfektionen in den Abschnitten 3-6 vorkamen (blau: Kontrolle, rot: PRG-1-Überexpression, E18,5 *p.c.*, AS = Abschnitt, Mittelwert mit SD, für den statistischen Vergleich zwischen Kontrolle und Überexpression wurden die einzelnen Abschnitte untereinander mit dem Mann-Whitney-Test berechnet, *pCAG* und *pCAG-mPRG1(FLAG)* je Plasmid n = 8 transfizierte PRG-1-ko-Embryonen, E = Embryonalstadium bei Transfektion, p = Signifikanzwert).

Transfektionen mit PRG-1-codierenden Plasmiden in PRG-1-ko-Embryonen (PRG-1-defizient, Abbildung 40 A) zeigten in der regionalen Verteilung der manipulierten Zellen über die eingeteilten 10 Abschnitte des dorsolateralen Kortexbereiches (Punkt C.3.4.5.2, Abbildung 10) signifikant höhere Fluoreszenzintensitäten in den Abschnitten 3-6 im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 40 B, Mann-Whitney-Test). In den Abschnitten 1-2 und 7-10 konnten in den ausgewerteten Schnittbildern keine signifikanten Unterschiede in der Fluoreszenzverteilung zwischen beiden Transfektionen der Kontrolle und PRG-1 beobachtet werden (Abbildung 40 B, Mann-Whitney-Test, *pCAG* und *pCAG-mPRG1-(FLAG)* je n = 8 transfizierte PRG-1-ko-Embryonen, p = Signifikanzwert).

D.2.3 Einfluss eines PRG-1 „knock out“ im kortikalen PRG-1-cko-Großhirn

Durch Transfektion einer Cre-Rekombinase (*pCAG-Cre*) konnte in der konditionalen PRG-1-Mauslinie (PRG-1-cko) ein zellulärer „knock out“ für das Protein PRG-1 geschaffen werden. Somit konnten in den nachfolgenden Versuchen PRG-1-defiziente Einzelzellstudien durchgeführt werden (Abbildung 41 A, unteres Bild). Zur Kontrolle wurde das Plasmid *pCAG*, ohne Insert für die Cre-Rekombinase angewendet (Abbildung 41 A, oberes Bild). Das Erscheinungsbild der GFP-positiven Zellen im somatosensorischen Kortex wurde zum Vergleich mit den Studien aus den Abschnitten D.2.1 und D.2.2 ebenfalls 3,5-4 Tage nach Transfektion

analysiert. Die durch *In-utero*-Elektroporation manipulierte Zellen wurden für beide Plasmide mit Histogrammmessungen vermessen und statistisch vergleichend ausgewertet (Abbildung 41 B).

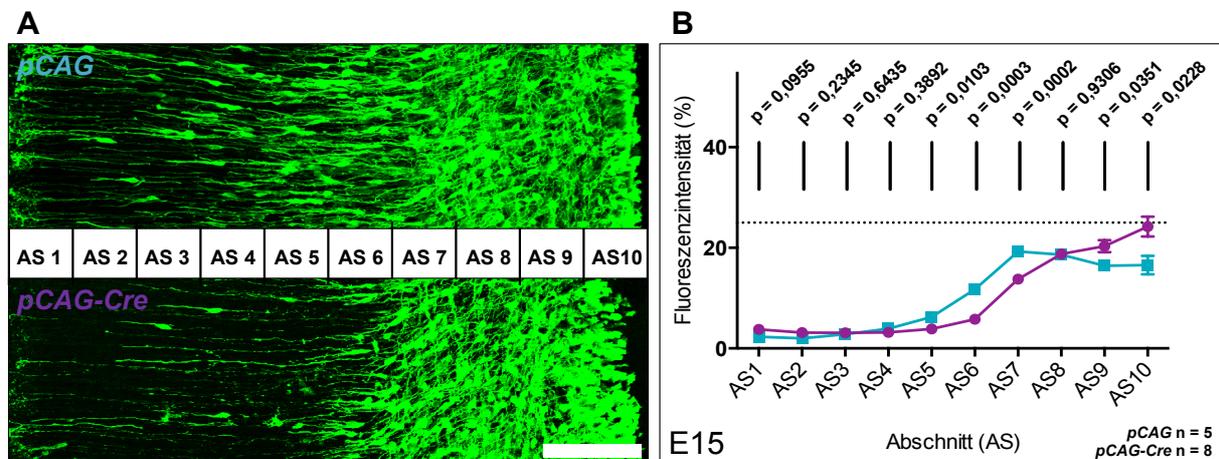


Abbildung 41: Zelluläre, PRG-1-defiziente Einzelzellmanipulation in konditionalen PRG-1-cko-Embryonen
(A) Transfektionen mit Cre-rekombinase-codierenden Plasmiden in konditionalen PRG-1-cko-Embryonen zeigten Unterschiede in der Verteilung manipulierter Zellen im somatosensorischen Kortexquerschnitt im Vergleich zu den Kontrollen (Messbalken = 100 Mikrometer). **(B)** In den Bereichen der Ventrikulär- und der Subventrikulärzone (Abschnitt 9 und 10) wurden mehr fluoreszierende Plasmide in den PRG-1-defizienten Schnitten detektiert. Fluoreszenzintensitätsmessungen in den Abschnitten 5-7, Bereiche der Intermediärzone und den unteren Schichten der kortikalen Platte, hatten dagegen signifikant geringere Werte gegenüber den Kontrollen (blau: Kontrolle, violett: Cre-Rekombinase, E18,5 *p.c.*, AS = Abschnitt, Mittelwert mit SD, für den statistischen Vergleich zwischen den Kontrollen und den durch Cre-Rekombinase transfizierten Zellen wurden die einzelnen Abschnitte untereinander mit dem Mann-Whitney-Test berechnet, *pCAG* n = 5 und *pCAG-Cre* n = 8 transfizierte PRG-1-cko-Embryonen, E = Embryonalstadium bei Transfektion, p = Signifikanzwert).

Die Auswirkungen eines Defizits von PRG-1 in einem intakten Gehirngewebe wurden durch einen provozierten zellulären „knock out“ des Proteins mittels der Transfektion der Cre-Rekombinase in das gefloxt System der konditionalen PRG-1-cko-Maus untersucht. Es zeigte sich, dass in den ersten 4 Abschnitten die prozentuale Verteilung aller Fluoreszenzsignale zwischen beiden Transfektionen (Cre-Rekombinase und Kontrolle) annähernd gleich war. Ab den Abschnitten 5-7, die die untere kortikale Platte und Bereiche der Intermediärzone darstellten, kam es zu einem verstärkten Vorhandensein der GFP-positiven Signale der Kontrollplasmide. Im Abschnitt 8 glichen sich die prozentualen Verteilungen beider Transfektionen an. In den Abschnitten 9 und 10 zeigte sich ein höherer prozentualer Anteil von GFP-Fluoreszenzen bei der Transfektion der Cre-Rekombinase gegenüber der Kontrolle (Abbildung 41 B, Mann-Whitney-Test, *pCAG* n = 5 und *pCAG-Cre* n = 8 transfizierte PRG-1-cko-Embryonen, p = Signifikanzwert).

D.3 Einfluss von LPP-1 und LPP-1a auf die neuronale Migration

Die Untersuchung des membranständigen Proteins LPP-1 und seiner Spleißvariante LPP-1a wurde für diesen Versuchsansatz als weitere Anwendung der durch die Etablierungsphase gewonnenen Analyseverfahren kortikaler Migrationen durch Transfektion neuronaler Stammzellen der Ventrikulärzone eingesetzt.

Aufgrund der fehlenden Möglichkeit eines LPP-1- oder LPP-1a-defizienten Mausmodells wurden für die nachfolgenden Versuche Transfektionen der Proteinheraufregulation und Proteinherunterregulation an C57BL/6-Inzuchtmäusen angewendet.

In der perinatalen Phase kommt es zu einer verstärkten Expression von LPP-1 und LPP-1a (siehe Abschnitt B.4.2). Aus diesem Grund wurde das Embryonalstadium E15 (*p.c.*) für die nachfolgenden Versuchsreihen transfiziert. Ein weiterer Vorteil von diesem Entwicklungsstadium war, wie unter Kapitel D.2 beschrieben, die Möglichkeit zur Untersuchung neuronaler Migrationsphänomene im sich entwickelnden somatosensorischen Kortex des Großhirns. Die Analyse der zellulären Manipulationen durch die *In-utero*-Elektroporationen wurde 3,5-4 Tage nach Transfektion (E18,5-E19) durchgeführt. Die Auswertung der Fluoreszenzbilder erfolgte mithilfe der Histogrammmessung (Auswerteprogramm MetaMorph®, Version 7.7.3, Sunnyvale, Kalifornien, USA).

D.3.1 Zelluläre Herunterregulation von LPP-1 und LPP-1a

Im ersten Versuchsansatz sollte die Auswirkung einer Herunterregulation („knock down“) von LPP-1 und LPP-1a auf die radiale, neuronale Migration im somatosensorischen Kortex untersucht werden. Dazu wurde eine in Zellkultur getestete shRNS-Variante („short hairpin“ RNS, *pCGLH-shRNA LPP1/-1a 230*) für diese Transfektionen von Prof. Dr. Anja Bräuer (Institut für Zell- und Neurobiologie, Charité Berlin, Deutschland) zur Verfügung gestellt (siehe Abschnitt C.2.2). Als Kontrolle wurde das Plasmid *pCGLH*, das keine shRNS-Kassette besaß, transfiziert (Abbildung 42 A, oberes Bild). Beide Plasmide hatten zur Wiederfindung das grün fluoreszierende Protein codiert (Abbildung 42 A). Zur Unterscheidung der Fluoreszenzverteilung der transfizierten Kortextbereiche im Großhirn wurden Histogramme der Kontrollen mit denen der shRNS-Transfektion verglichen (Abbildung 42 B).

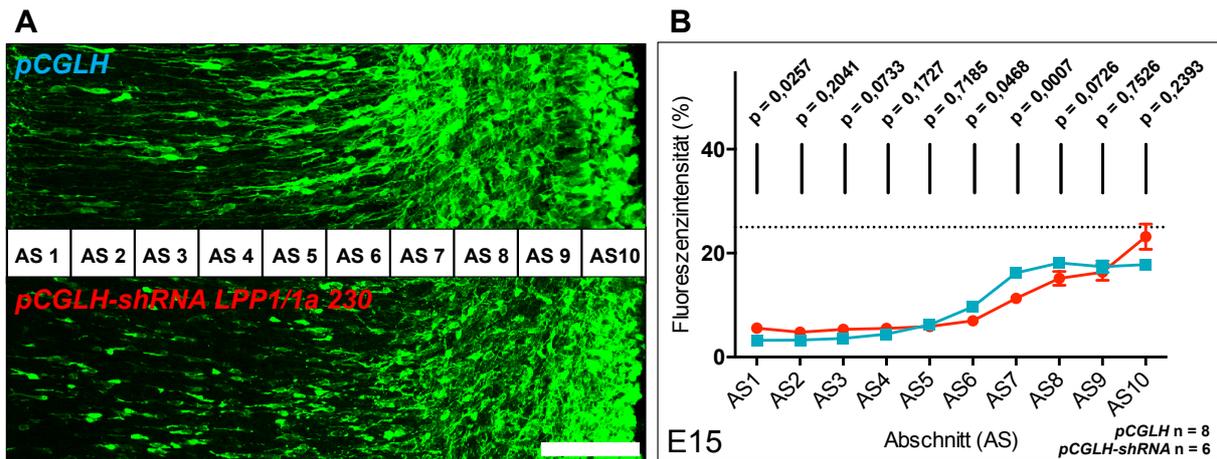


Abbildung 42: Zellulärer „knock down“ der Proteine LPP-1 und LPP-1a in vivo durch Plasmidtransfektionen

(A) Die Aufnahmen zeigen Beispiele der transfizierten Bereiche des somatosensorischen Kortex im Großhirn (Bild oben: Kontrolle durch Transfektion mit dem Plasmid *pCGLH*, Bild unten: „knock down“ durch Transfektion mit dem Plasmid *pCGLH-shRNA LPP1/-1a 230*, Messbalken = 100 Mikrometer). (B) Die Auswertungen der prozentualen Verteilung GFP-positiver Signale durch Fluoreszenzhistogramme ergaben, dass im Bereich Intermediärzone (Abschnitte 6 und 7) mehr Fluoreszenzsignale in den Kontrollschnitten zu finden waren. Im oberen Bereich der kortikalen Platte (Marginalzone, Abschnitt 1) wurden signifikant höhere Fluoreszenzen bei den LPP-1- und LPP-1a-herunterregulierten Schnitten gefunden (blau: Kontrolle *pCGLH*, rot: *pCGLH-shRNA LPP1/-1a 230*, E18,5 p.c., AS = Abschnitt, Mittelwert mit SD, für den statistischen Vergleich zwischen den Kontrollen und den LPP-1- und LPP-1a-herunterregulierten („knock down“) Zellen wurden die einzelnen Abschnitte untereinander mit dem Mann-Whitney-Test berechnet, *pCGLH* n = 8 und *pCGLH-shRNA LPP1/-1a 230* n = 6 transfizierte Embryonen, E = Embryonalstadium bei Transfektion, p = Signifikanzwert).

„Knock down“ von LPP-1 und LPP-1a führte dazu, dass im Bereich der Intermediärzone weniger, im Bereich der Marginalzone mehr Fluoreszenzen gegenüber den Kontrolltransfektionen zu messen waren. So konnten signifikant höhere Werte der Fluoreszenzsignale im somatosensorischen Kortex in den Abschnitten 6 und 7 bei Transfektionen mit dem Kontrollplasmid *pCGLH* im Vergleich zu Transfektionen mit der *pCGLH-shRNA LPP1/-1a 230* gemessen werden. Im Bereich des Abschnittes 1, der die Marginalzone der kortikalen Platte mit einschließt, wurde in den Kontrollen weniger GFP-positive Signale detektiert. Die verbleibenden Abschnitte der kortikalen Platte und die der Ventrikulär- und Subventrikulärzone zeigten zwischen beiden Transfektionen keine signifikanten Unterschiede in der prozentualen Verteilung GFP-positiver Fluoreszenzen (Abbildung 42 B, Mann-Whitney-Test, *pCGLH* n = 8 und *pCGLH-shRNA LPP1/-1a 230* n = 6 transfizierte Embryonen, p = Signifikanzwert).

D.3.2 Zelluläre Überexpression von LPP-1 im LPP-1-wt-Großhirns

Auswirkung einer Herunterregulation von LPP-1 und LPP-1a wurden durch die gewonnenen Daten aus Abschnitt D.3.1 beschrieben. In dieser Versuchsreihe sollte die prozentuale Verteilung transfizierter Zellen im somatosensorischen Kortex nach einer Überexpression von LPP-1 studiert werden. Dazu wurden die Embryonen mit dem Plasmid *pCAG-LPP1* transfiziert (Abbildung 43 A, unteres Bild). Zur Kontrolle wurde das Plasmid *pCAG* durch die *In-utero*-Elektroporation in die neuronalen Vorläuferzellen eingebracht (Abbildung 43 A, oberes Bild). Auswertungen der grün fluoreszierenden Signale gaben Aufschluss über die Verteilung der transfizierten Zellen im kortikalen Querschnitt des Großhirns von der Marginal- zur Ventrikulärzone (Abbildung 43 B).

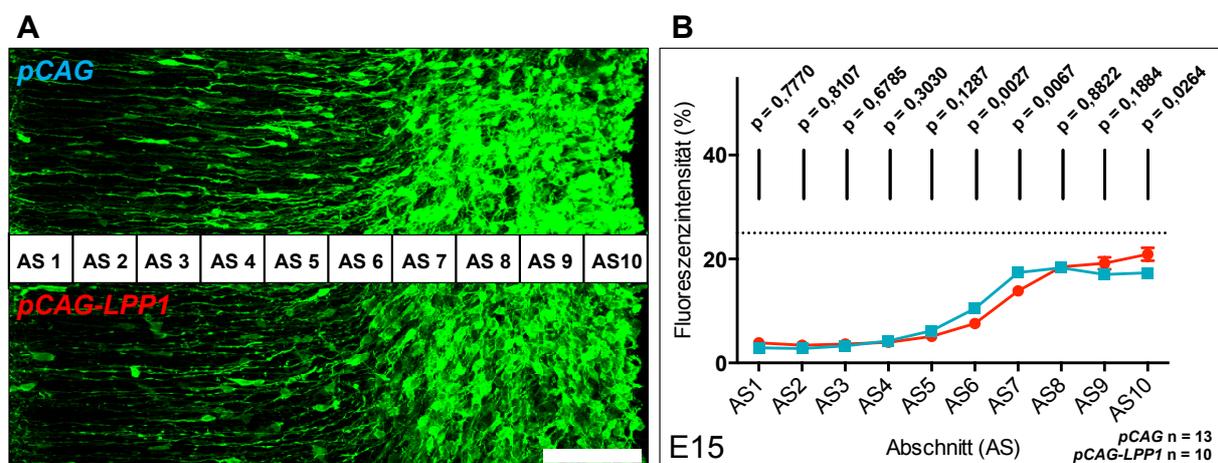


Abbildung 43: Auswirkungen der LPP-1-Überexpression auf die prozentuale Verteilung transfizierter Zellen im Vergleich zur Kontrolle im somatosensorischen Kortex

Die Bildausschnitte (A) zeigen Beispiele der Transfektionen, die mit dem Plasmid *pCAG* (Kontrolle) und im Vergleich mit dem Überexpressionsplasmid *pCAG-LPP1* gemacht wurden (Bild oben: Aufnahme einer Kontrolltransfektion mit *pCAG*, Bild unten: Überexpression des Proteins LPP-1 durch Transfektion mit dem Plasmid *pCAG-LPP1*, Messbalken = 100 Mikrometer). (B) Im Vergleich der Histogrammberechnungen beider Plasmidtransfektionen wurden signifikant höhere Werte in der Überexpressionsfluoreszenz im Abschnitt 10 (ventrikulären Zone) und weniger im Vergleich zur Kontrolle in den Abschnitten 6 und 7 (Intermediärzone) gemessen (blau: Kontrolle *pCAG*, rot: Überexpression *pCAG-LPP1*, E18,5 *p.c.*, AS = Abschnitt, Mittelwert mit SD, für den statistischen Vergleich beider Transfektionen wurden die einzelnen Abschnitte untereinander mit dem Mann-Whitney-Test berechnet, *pCAG* n = 13 und *pCAG-LPP1* n = 10 transfizierte Embryonen, E = Embryonalstadium bei Transfektion, p = Signifikanzwert).

Wurde LPP-1 durch Transfektion der neuronalen Vorläuferzellen der ventrikulären Zone im Großhirn hochreguliert, kam es 3,5-4 Tage nach Eingriff zu keinem prozentual unterschiedlichen Fluoreszenzwert in den ersten 5 Abschnitten im Vergleich zur Kontrolle. Im anschließenden Bereich der Intermediärzone der Abschnitte 6 und 7 zeigte sich eine geringere prozentuale Verteilung der GFP-positiven Signale in den LPP-1-hochregulierten Gehirnen. Im Übergang zur Subventrikulärzone glichen sich die Fluoreszenzwerte beider Transfektionen an und es gab keine signifikanten Unterschiede in den Abschnitten 8 und 9. Im letzten be-

rechneten Abschnitt 10 des transfizierten somatosensorischen dorsolateralen Kortexquerschnitts stieg der Anteil fluoreszierender Proteine in LPP-1-hochregulierten Zellen signifikant an (Abbildung 43 B, Mann-Whitney-Test, $pCAG$ $n = 13$ und $pCAG-LPP1$ $n = 10$ transfizierte Embryonen, $p =$ Signifikanzwert).

D.3.3 Zelluläre Überexpression von LPP-1a im LPP-1a-wt-Großhirn

Im vorangegangenen Teil dieser Arbeit wurde erörtert, dass im Vertebratengehirn die natürliche Expression des membranständigen Proteins LPP-1a im Vergleich zu LPP-1 ungefähr 10-fach höher ist (siehe Abschnitt B.4.2). Aus diesem Grund wurde vermutet, dass eine Überexpression von LPP-1a in C57BL/6-Wildtypgehirnen einen stärkeren Effekt auf das migratorische Verhalten transfizierter Zellen haben könnte. Zum Nachweis des Transfektionserfolges wurden die Kontrollen ($pCAG$) und die Überexpressionen ($pCAG-LPP1a$) mit einem GFP-codierenden Plasmid manipuliert (Abbildung 44 A, oberes Bild: Transfektionen mit dem Kontrollplasmid $pCAG$, unteres Bild: Transfektionen mit dem LPP-1a-überexprimierenden Plasmid $pCAG-LPP1a$). Um die durch die Fluoreszenzaufnahmen bestätigten Transfektionen statistisch miteinander vergleichen zu können, wurden Histogrammanalysen der einzelnen Abschnitte angefertigt und ausgewertet (Abbildung 44 B).

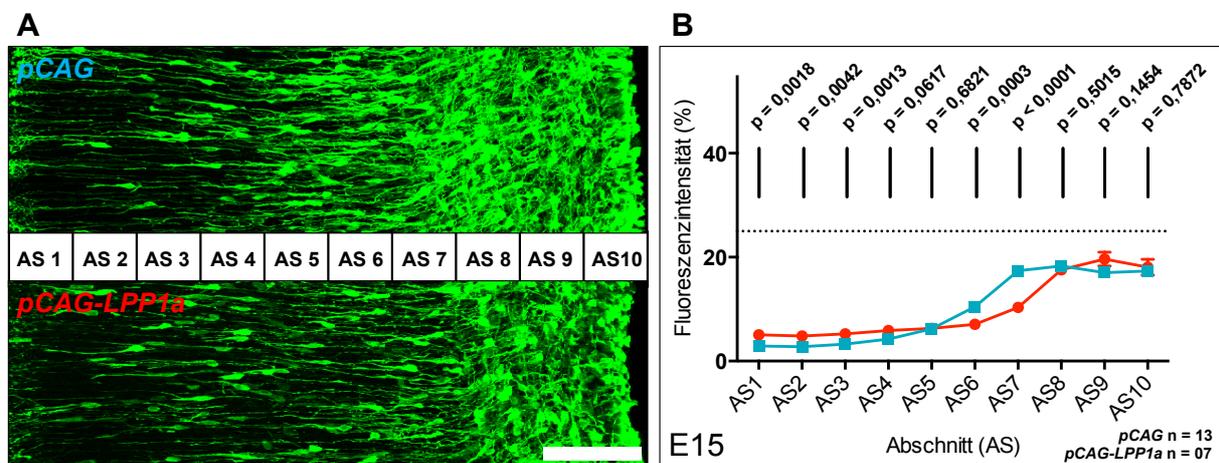


Abbildung 44: Überexpressionsstudie mit der Spleißvariante LPP-1a

(A) GFP-positive Fluoreszenzaufnahmen des somatosensorischen Kortexquerschnitts mit (Bild oben) Kontroll- und (Bild unten) Überexpressionstransfektionen von LPP-1a (Messbalken = 100 Mikrometer). (B) In der Berechnung der Histogramme der GFP-positiven Fluoreszenzsignale war anzunehmen, dass die Zellen indirekt in den ersten 4 Abschnitten eine verstärkte und in den Abschnitten 6 und 7 eine verringerte Expression des transfizierten Proteins LPP-1a im Vergleich zur Kontrolle hatten (blau: Kontrolle $pCAG$, rot: Überexpression $pCAG-LPP1a$, E18,5 *p.c.*, AS = Abschnitt, Mittelwert mit SD, für den statistischen Vergleich beider Transfektionen wurden die einzelnen Abschnitte untereinander mit dem Mann-Whitney-Test berechnet, $pCAG$ $n = 13$ und $pCAG-LPP1a$ $n = 7$ transfizierte Embryonen, E = Embryonalstadium bei Transfektion, $p =$ Signifikanzwert).

In den oberen und mittleren Bereich der kortikalen Platte des Großhirns konnten nach Transfektionen des LPP-1a-überexprimierenden Plasmids signifikant größere Effekte in der prozentualen Häufigkeit fluoreszierender Proteine gegenüber den Kontrollen gemessen werden. In Abschnitt 5, der die tiefen Schichten der kortikalen Platte einschließt, wurde kein Unterschied in der Fluoreszenzstärke des GFP-Signals zwischen beiden Transfektionen detektiert. In den Abschnitten der anschließenden Intermediärzone kam es, wie bei den Transfektionsversuchen zuvor (siehe Abschnitte D.3.1 und D.3.2) zu signifikant höheren Fluoreszenzsignalen bei den Kontrollen. In den letzten 3 Abschnitten der prozentualen Querschnittsverteilung der GFP-Signale im somatosensorischen Kortex ähnelten sich die Werte beider Plasmidtransfektionen und es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildung 44 B, Mann-Whitney-Test, *pCAG* n = 13 und *pCAG-LPP1a* n = 7 transfizierte Embryonen, p = Signifikanzwert).

E Diskussion

E.1 Etablierung der *In-utero*-Elektroporationstechnik mit C57BL/6-Mäusen

Die vorgestellte mikromanipulative Operationstechnik von murinen Embryonen, genannt „*In-utero*-Elektroporation“, wurde um das Jahr 2000 erstmalig beschrieben (Saito und Nakatsuji 2001; Tabata und Nakajima 2001). Forschungen mit dieser Art der Zelltransfektion wurden bis zur heutigen Zeit in verschiedenen Varianten der Durchführung veröffentlicht (u. a. Borrell et al. 2005; Saito 2006; dal Maschio et al. 2012; Holland et al. 2012). Die *In-utero*-Elektroporation gehört zu den nicht viralen Transfektionsmethoden zur Einbringung von Fremd-DNS in lebende Zellen und Geweben.

Das primäre Ziel dieser Arbeit bestand darin, die *In-utero*-Elektroporation als eine standardisierte Anwendungsmethode für Forschungsschwerpunkte der neuronalen Signaltransduktion, Zellentwicklung und Zellmigration verwenden zu können. Dazu wurden für diese Arbeit Versuchsreihen am C57BL/6-Wildtypmausstamm durchgeführt. Dieser kongene Mausinzuchtstamm wird mehrheitlich in der humanmedizinisch orientierten neuroanatomischen Forschung verwendet. Außerdem wird dieser Stamm im europäischen Raum bevorzugt für Rückkreuzungen generierter „Knock-out“- und „Knock-in“-Linien genutzt (Lein et al. 2007).

E.1.1 Etablierung und Optimierung der Elektroporation und der Transfektion *in vivo*

Recherchierte Grunddaten der *In-utero*-Elektroporation anderer Mausmodelle und geführte Korrespondenzen mit bekannten Experimentatoren (u. a. Mladen-Roko Rašin, Department of Neurobiology, Yale University, New Haven, USA, und Victor Borrell, Institut für Neurowissenschaften, Universidad Miguel Hernandez, Alicante, Spanien) zeigten, welche Einflüsse die Variationen der Intervalllängen und -pausen einzelner Impulse bei der Spannungsabgabe während Elektroporation für die Auswertbarkeit der Transfektion hatten. So zeigte sich, dass mit wachsender Anzahl der Impulse je Elektroporation die durchschnittliche Letalität der manipulierten Embryonen anstieg (Saito und Nakatsuji 2001; Takahashi et al. 2002). Im Gegenzug kam es bei Elektroporationsversuchen mit geringer Impulsanzahl verstärkt zu „falsch positiven“ Ergebnissen, die sich durch Fehlen der transfizierten Plasmide in den behandelten Zellen darstellte (Saito und Nakatsuji 2001).

Mit der Einführung der *In-utero*-Elektroporation konnten Werte für Pulslängen und Intervallpausen zwischen den Impulsen einer Transfektion durch bereits Jahre zuvor durchgeführte *In-ovo*-Elektroporationen als Vorlage genutzt werden (Itasaki et al. 1999). So wurden Intervalllängen der Impulse auf 50 Millisekunden und die dazwischenliegenden Intervallpausen auf 950 Millisekunden festgelegt und in vielen weiteren Veröffentlichungen erfolgreich übernommen. Eine wiederholte Testung dieser beständigen Elektroporationsdaten würde nur unnötige Tierversuche bei gleichbleibendem Ergebniserfolg zur Folge haben. Deshalb wurden diese Standardwerte für die Nutzung des Elektroporators (CUY, NEPA GENE Co., Japan) verwendet (Intervallpausen von 950 Millisekunden und Impulse von 50 Millisekunden, mit einer Pulsanzahl von 5 Impulsen je Transfektion).

Die Größe der einzusetzenden Spannung je Transfektion wurde aufgrund von widersprüchlichen Daten innerhalb von Veröffentlichungen anderer Forscher, vor allem in Bezug auf die Auswirkungen des Transfektionserfolges, das Wohlbefinden und das Überleben der tragenden Maus und der transfizierten Embryonen, als erste Standardgröße in dieser Arbeit bestimmt. Durch die Verwendung variierender Mausstämmen kam es zu einer großen Variabilität der angegebenen Spannungen für die Transfektionen. Z. B. gewann Tetsuichiro Saito und N. Nakatsuji 2001 erfolgreiche Daten mit eingesetzten Spannungen von 45 Volt und mehr für seine Transfektionen im ICR-Auszuchtstamm („Imprinting Control Region“). Ähnliche Werte zeigte auch die Experimentatoren Mladen-Roko Rašin und J.G. Chen 2005 mit dem CD-1-Auszuchtstamm. Hingegen veröffentlichte H. Tabata und K. Nakajima 2001 Transfektionsdaten mit maximalen Spannungen von 30 bis 35 Volt in ICR Mäusen.

Die Ergebnisse der Spannungswerte aus dieser Testreihe wurden durch Manipulation von Embryonen unterschiedlichen Alters bestimmt. Durch die hier gewonnenen Erkenntnisse ist es in späteren Versuchen möglich, die gemessenen Grenzwerte der Spannung je Embryonalstadium als feste Standardparameter zu verwenden und somit genormte Versuchsbedingungen zu definieren (Abbildung 11 und Abbildung 12). Die optimalen Spannungswerte für Transfektionen einzelner Embryonen wurden nach den Kriterien einer möglichen Letalität und des Transfektionserfolges bestimmt. So war die Wahrscheinlichkeit, dass die Embryonen durch den Eingriff mit 10-40 Volt bei Transfektionen im Embryonalstadium E12-E12,5 überleben, höher, als die, daran zu sterben (Abbildung 11A). Wobei es bei höheren Spannungswerten dieser Messreihen fast zum vollständigen Absterben der Embryonen im Uterus kam. Die Transfektionserfolge mit den injizierten Plasmiden zeigten jedoch, dass unter 30 Volt nur eine sehr geringe Anzahl an Embryonen positiv transfizierte Zellen vorzuweisen hatte (Abschnitt D.1.2.7). Somit wurden die untere Grenze der Voltzahl für jede Transfektion, unabhängig des Embryonalalters, bei 30 Volt vorgegeben.

Stadien, die vor dem 12. Embryonaltag transfiziert werden sollen, können sinnvoll nur mittels ultraschallgestützter Elektroporation durchgeführt werden (Gaiano et al. 1999; Takahashi et al. 2002), da die Injektion unter Sicht nicht möglich ist. Transfektionsversuche wurden ab dem 18. Trächtigkeitstag nicht mehr durchgeführt, da die postoperative Regenerationsphase der tragenden Maus sich mit dem Wurfzeitpunkt überschneidet (Checiu et al. 1977). Die dadurch entstehenden Belastungen für das adulte Weibchen würden zu fast vollständigen Verlusten der Jungtiere während und kurz nach der Geburt führen. Sollten jedoch in dieser Phase Transfektionen erwünscht sein, empfiehlt sich eine Injektion eines zusätzlichen im Plasmid codierten Liganden, der durch Gabe von z. B. Östrogenen (Tamoxifen) aktiviert wird (Danielian et al. 1998).

Eine Spannung über 40 Volt ist nicht zu empfehlen, da das tragende Weibchen die Manipulation nur schwer verkraftet. Es gab negative Auswirkungen auf das Wohlbefinden der Embryonen bei vollständigen Transfektionen (Injektionen von Plasmiden mit anschließender Elektroporation) im Vergleich zu Elektroporationen ohne Injektionen (Abschnitt D.1.2.6). Dies kann zumindestens partiell durch fehlerhafte Eingriffe der Injektion verursacht worden sein. Obwohl die Kapillare bei der Injektion mithilfe einer Stereolupe an der embryonalen Kopfanlage positioniert wurde, konnte hierbei nicht ausgeschlossen werden, dass es eventuell zu kleineren Gefäßverletzungen während der Injektion kam. Durch Einblutungen in den Ventrikelraum kann es zu Begleiterscheinungen, die z. B. einen fetalen Schlaganfall (Huang et al. 2006) oder einen Wasserkopf (Gupta und Sharma 2009) verursachen, kommen. Die erhöhte Letalität der Embryonen nach Transfektionen könnte auch durch das Einbringen von Fremdmaterial mit der Injektion verursacht worden sein. Obwohl die Spitzen der Kapillaren mithilfe eines Mikroschleifers bearbeitet, mikroskopisch auf Fehler kontrolliert und am Ende der Fertigstellung sterilisiert wurden, könnten kleine Glasbrüche und Glasstaub durch die Injektionen in die Großhirnanlage der zu transfizierenden Embryonen übertragen worden sein. Aufgrund der hohen Filtrierate der zerebrospinalen Flüssigkeit wäre es wahrscheinlich, dass diese Fremdmaterialien Verschlüsse oder Schäden des Ventrikelsystems verursacht haben.

Es zeigte sich nach Durchführung der Einzelschritte der *In-utero*-Elektroporation, dass die Operationsdauer ein entscheidender Faktor für das Wohlbefinden der tragenden Maus und der Embryonen war (Abschnitt D.1.2.8). Die tragenden Mäuse zeigten nach langfristigen Operationen Auffälligkeiten wie apathisches Verhalten, Inappetenz, Isolierung und fehlende Fellpflege. Begleitet waren diese Erscheinungen durch eine erhöhte Fruchtresorption, Einblutungen im Uteruslumen und teilweisen Abort. Durch postoperative Belastungsprotokolle, die wichtige Parameter des Erscheinungsbildes und Verhaltens der Tiere quantifizierten (Anhang 3), konnten Rückschlüsse eines negativen Effektes auf den Transfektionserfolg bei länger andauernden Operationszeiten gezogen werden. So kam es bei Operationen, die län-

ger als 30 Minuten dauerten, zu einer erhöhten Sterblichkeit der Uterusfrüchte im Mutterleib oder zur vernachlässigten Fürsorge der Jungtiere nach der Geburt. Der Zusammenhang einer zeitlich verlängerten Operation mit einer erhöhten Letalität der Embryonen könnte durch folgende Hypothesen erklärt werden:

Zum einen wurde bei länger andauernden Operationen mit Injektionsnarkosen (Ketamin-Xylazin-Mix, Tabelle 6) oft mit Nachdosierungen des Narkotikums gearbeitet. Es wurde publiziert, das Xylazin die Plazentaschranke passieren und durch die Wirkung der Substanz eine Erniedrigung der Herzschlagfrequenz bei den Embryonen provoziert werden kann. Dadurch erhöht sich die Wahrscheinlichkeit eines Absterbens der Früchte, was zum teilweisen oder vollständigen Abort führen kann (Skarda et al. 1970; Magda et al. 1971). Durch Änderung der Narkoseart kann diesem Problem gegengesteuert werden. So könnte durch den Einsatz einer Inhalationsnarkose (Iso- oder Sevofluran) oder einer vollständig antagonisierbaren Injektionsnarkose (Medetomidin, Midazolam und Fentanyl) die negative Wirkung von Xylazin ausgeschlossen werden. Ein weiteres Problem der verlängerten Operationszeit war die Austrocknung der inneren Bauchorgane. Der abdominale Eingriff war ein verhältnismäßig großer Eingriff im Wasserhaushalt der tragenden Maus, der mit einer möglichen Verdunstung des Körperwassers durch die Operationswunde einhergeht. Es wurde versucht, diesen Verlust des Körperwassers durch permanente Zuführung steriler Kochsalzlösung zu kompensieren. Durch langwierige Eingriffe stieg jedoch die Wahrscheinlichkeit eines Defizits zwischen abgegebener und künstlich zugeführter Flüssigkeit. Bei unzureichendem Wasserhaushalt kann es zum Absterben von Uterusfrüchten kommen, da die Versorgung der Embryonen über den Körperkreislauf der Mutter negativ beeinflusst wurde. Neben der Verdunstung von Körperflüssigkeiten über die eröffnete Bauchhöhle kann es noch zum Problem der Unterkühlung des operierten Tieres und der Embryonen kommen. Obwohl versucht wurde, den Wärmeverlust durch die Nutzung einer Heizplatte während und nach der Operation auszugleichen, musste diese Problemquelle mit berücksichtigt werden. Z. B. wird durch Unterkühlung (Hypothermie) der neuronale Zelltod durch Fehlen der protektiven Wirkung von Zink hervorgerufen (Tsuchiya et al. 2002), oder körpereigene Immunreaktionen werden negativ beeinflusst (Sabiston et al. 1978). Hypothermie hat zudem Einfluss auf den Blutkreislauf, die Organfunktionen und Stoffwechselprozesse im Körper und kann dadurch die Letalität der manipulierten Tiere erhöhen (Davis 1968). Durch unsachgemäße Elektroporation können Schäden am und im Uterus herbeigeführt werden. So wurde veröffentlicht, dass die Zuführung von zu hohen Spannungsfeldern die Gebärmutterschleimhaut (*Endometrium*) negativ beeinflusst (Letterie et al. 1993), oder dass länger andauernder Kontakt zwischen Gewebe und Spannungsquelle zu Schäden durch lokale Erwärmungen führen kann (Martin et al. 2002).

Aufgrund des nicht nachzuweisenden Transfektionserfolges und der postoperativ entstehenden negativen Belastungen für die tragenden Mäuse wurde bei Operationen von mehr als 30 Minuten Dauer zum Wohle der Versuchstiere die Euthanasie in tiefer Narkose als geringeres Übel angesehen.

E.1.2 Transfektion unterschiedlicher Plasmide

Die Vielfalt der Plasmide hat sich aufgrund der Vorteile zellulärer Transfektionen *in vivo* und *in vitro* in den letzten Jahren erhöht. Während anfänglich oft selbst klonierte Plasmide zum Einsatz kamen, ist in den letzten Jahren eine große Bandbreite kommerziell erhältlich geworden.

Um nicht unnötig Tiere in Versuchen mit Transfektionen zu manipulieren, wurden im Sinne des 3R-Prinzips („Replace, Refine, Reduce“ = Ersetzen, Verbessern, Reduzieren; Russell 1995) alle Plasmide vor einer *In-vivo*-Anwendung mithilfe von Zellkulturtransfektionen analysiert. Durch diese Möglichkeit konnten Modifikationen der Plasmide, die Verbesserungen in den Transfektionseigenschaften sowie in der Proteinbildung haben sollten, getestet werden. Der Vorteil einer *In-utero*-Elektroporation besteht darin, dass es in kurzer Zeit möglich ist, viele unterschiedliche Gene und deren Auswirkungen auf den zellulären Haushalt verschiedener Gewebe zu testen. Auf diese Art und Weise können viel schneller Zusammenhänge in der Molekularbiologie und Signaltransduktion erkannt und erforscht werden. In den hier durchgeführten *In-vivo*-Transfektionen wurden die Plasmide *pCAG-DsRed2*, *pCAGIG* und *pCAGGS*, alle quantitativ durch hohe Kopienzahlen bekannt (Matsuda und Cepko 2004; Brandt et al. 2007), verwendet. Dadurch waren die Fluoreszenzen nach erfolgreichen Transfektionen deutlich zu erkennen.

Nachdem die Koordinaten für eine Injektion der Plasmide im Ventrikelraum eines Mausembryos bestimmt worden waren (Abschnitt D.1.2.2), wurden verschiedene Methoden der Injektionsgabe getestet. Mithilfe stereotaktischer Injektionen kam es verstärkt zum Problem einer zeitlichen Verzögerung bei der Operation, da die Arbeitswinkel und die Ausrichtungen der Mikromanipulatoren oft umständlich geändert werden mussten. Eine vorsichtige, manuelle Handhabung der Embryonen wurde gegenüber dem stereotaktischen Verfahren bevorzugt. Für die direkte Injektion der Plasmide wurden Mundpipetten und deren Modifikationen mit Spritzenaufsätzen oder Mikropumpen getestet. Injektionen, die durch Mundpipetten erfolgten, ließen sich am besten steuern, da mit geringem Druck und freien Händen gearbeitet werden konnte. Injektionen mit Spritzenaufsätzen und Mikropumpen hatten den Vorteil der genauen Dosierung der Volumina und Drücke.

Der Nachweis einer erfolgreichen Transfektion von Zellen bereits 10 Minuten nach der *In-utero*-Elektroporation wurde von Tetsuichiro Saito veröffentlicht (Saito und Nakatsuji 2001). Diese Daten widersprechen den Erfahrungen von Victor Borrel (Institut für Neurowissenschaften, Alicante, Spanien), der eine erfolgreiche Expression der eingebrachten DNS Sequenzen erst 24 Stunden nach der Manipulation feststellen konnte (persönliche Mitteilung).

Neuronale Zellzyklen (Takahashi et al. 1995), Migrationen (Taniguchi et al. 2012) und Proteinexpressionen (Shim et al. 2010) unterscheiden sich innerhalb weniger Stunden im Verlauf der murinen, embryonalen Entwicklung. Durch diese zeitliche Differenz einer erfolgreichen *In-utero*-Elektroporation von 24 Stunden (beschriebene Abweichung zwischen Saito und Borrel) existierte, bei einer Trächtigkeit der Mäuse von ungefähr 19 Tage (C57BL/6), eine deutliche Fehlerquelle in der Interpretation der Auswirkungen transfizierter Plasmide. Aus diesem Grund musste der Beginn der Bildung von transfizierten Proteinen bestimmt werden (Abbildung 17). Plasmide, die fluoreszierende Proteine codierten, waren ideal für den Nachweis des Expressionsbeginns nach Transfektion. In den eigens durchgeführten Transfektionsversuchen konnte der Großteil der transfizierten Gehirne 12 Stunden nach Manipulation aufgrund der exprimierten Fluoreszenzproteine nachgewiesen werden. Die ersten positiven, jedoch unzureichenden Signale konnten in vereinzelt Transfektionen frühestens 6 Stunden nach *In-utero*-Elektroporation detektiert werden. Aufgrund der hier gewonnenen Erkenntnisse über den Beginn der manipulierbaren Proteinbildung nach Transfektionen werden zukünftige Versuche frühestens 12 Stunden vor dem gewollten Eingriff in den natürlichen zellulären Proteinhaushalt durchgeführt.

Da diese Art der Transfektion von Plasmiden nur Zellen aus der ventrikulären und teilweise der subventrikulären Zone betrifft, entstanden neue Fragen über die Stabilität der Plasmide in der Teilung und Weitergabe an die Tochterzellen. Es sollte geklärt werden, ob durch die asymmetrische und symmetrische Zellteilung der transfizierten Vorläuferzellen die eingebrachten Plasmide oder die daraus entstandenen Proteine an die neu entstandenen multipotenten und postmitotischen Tochterzellen weitergegeben wurden. Andererseits galt es zu untersuchen, ob durch die permanenten Zellteilungen der Vorläuferzellen die transfizierten Plasmide ausgeschwemmt werden und damit die Bildung der neu eingebrachten Proteine in den Zellen abnehmen oder sogar verschwinden kann (siehe Abschnitt D.1.2.5). Die Anzahl der transfizierten Zellen stieg mit der Zeit deutlich. Da sich die Mitoserate der neuronalen Vorläuferzellen in höheren Embryonalstadien verlangsamt (Takahashi et al. 1995), aber der prozentuale Anteil der transfizierten Zellen linear zunahm, konnte davon ausgegangen werden, dass nicht nur die eingebrachten Proteine, sondern auch die Plasmide an die multipotenten und postmitotischen Tochterzellen abgegeben wurden. Wären die Plasmide in den ursprünglichen Stammzellen verblieben und nur die gebildeten Proteine an die Tochterzellen

abgegeben worden, wäre der prozentuale Anstieg der transfizierten Zellen nicht so deutlich gewesen. Vielmehr wäre es zu einem Plateau der Kurve des prozentualen Anteils transfizierter Zellen gekommen, da neben der absinkenden Teilungsrate der Vorläuferzellen auch die Apoptoserate der Zellen im neuronalen Gewebe mit dem Embryonalalter ansteigt (de la Rosa und de Pablo 2000). Der Erfolg von Zelltransfektionen mit Übernahme der Eigenschaften durch die eingebrachten Proteine konnte in eigenen Versuchen nach über 30 Tage (Trimbuch et al. 2009) und länger (Lehmann et al. 2012) nachgewiesen werden.

Aufgrund dieser Erkenntnisse muss in weiterführenden Transfektionsstudien die Tatsache beachtet werden, dass nach einer Transfektion die Manipulation des Proteinhaushaltes in den Zellen und in den Tochterzellen, unabhängig von postmitotischen oder multipotenten Zellen, anhält.

Nachdem die Einzeltransfektionen genauer untersucht und standardisiert wurden, sollte der Einsatz möglicher Kombinationen aus mehreren Plasmiden in einer Transfektion getestet werden (Abschnitt D.1.2.9).

Aus den durchgeführten Versuchsreihen zur Doppeltransfektion ergab sich, dass die vorteilhaftesten Konzentrationsmischungen bei Transfektionen eines Standardvektors kombiniert mit einem fluoreszenzverstärkenden Plasmid zwischen 1:1/4 und 1:1/8 lagen (Standard- zu Markierungsvektor, Abbildung 25). In diesen Doppeltransfektionen waren noch signifikant viele der transfizierten Embryonen detektierbar, jedoch war die Wahrscheinlichkeit, nur mit Markierungsvektor exprimierende Zellen vorzufinden, gering. Aufgrund dieser gewonnenen Daten wurde in weiterführenden Studien bei fluoreszenzverstärkenden Doppeltransfektionen ein Standardmischverhältnis von 1:1/4 bis 1:1/8 (Standard- zu Markierungsvektor) angewendet.

Aus den Versuchen Punkt D.1.2.9 B und C ergab sich, dass für Doppeltransfektionen mit dem Hintergrund der Untersuchung einzelpositiver Zellen die Methode der *In-utero*-Elektroporation der einzelnen Hemisphären mit je einem Plasmid von Vorteil ist. Diese methodische Anwendung könnte bei Untersuchungen von 2 zu erwartenden unterschiedlichen Aussagen durch die Plasmidtransfektionen von Bedeutung sein. Es ist bekannt, dass bei Nagern die embryonalen Entwicklungszeiten der Uterusfrüchte in einer tragenden Maus variieren können (Theiler 1989). Aufgrund dieser Entwicklungsproblematik bei den Embryonen wäre der Vergleich von Transfektionen mehrerer Plasmide im gleichen Embryo gegenüber Einzeltransfektionen in unterschiedlichen Embryonen von Vorteil. Die Methode der Transfektion 2er Plasmide in eine Hemisphäre eignet sich am besten zur Untersuchung des Zusammenspiels von transfizierten Proteinen, da hier ein hoher Anteil an doppelt transfizierten Zellen

vorkam. So könnte es z. B. zu einer Aufhebung oder einer Verstärkung der eigentlichen Transfektionseffekte kommen.

Die Methode der Transfektion von Fusionsproteinen wurde erfolgreich *in vivo* durch die *In-utero*-Elektroporation getestet und kann für zukünftige Transfektionsstudien als ein direkter Nachweis der Bildung von Plasmid-codierenden Proteinen genutzt werden (Abschnitt D.1.3.1). Mit der Einbindung eines indirekten Nachweisverfahrens über Bildung von Stoffwechselprodukten des Fremdproteins in der Zelle konnte die Wirkung der Transfektion bestimmt werden.

Der Einsatz der ROSA26-loxP-Maus in Kombination mit Transfektion der Cre-Rekombinase (Imayoshi et al. 2006) diente zur Kontrolle der Funktionsfähigkeit eingebrachter Plasmide durch die *In-utero*-Elektroporation. Der Nachweis einer genetischen Manipulation von Zielzellen durch die Unterstützung einer Elektroporation sollte für spätere Deutungen zellulärer Veränderungen bestätigt sein. Die am häufigsten in *in vivo* Versuchen eingesetzten Plasmide sind zwar mit Fluoreszenz-codierenden Gensequenzen ausgestattet, jedoch gibt es häufig keine direkte Kopplung am einzubringenden Gen („gene of interest“). Dadurch exprimiert die Zelle die durch die Plasmide eingebrachten Proteine separat. D.h., es kann ein Fluoreszenzsignal als eine falsch positive Transfektion gedeutet werden, obwohl die eigentlich eingebrachte Gensequenz für den Untersuchungsschwerpunkt nicht funktional ist. Um diesen Fehler auszuschließen, bietet es sich an, Genesequenzen in die Zelle einzubringen, die Epitope an den zu produzierenden Proteinen bilden (z.B. FLAG, Abschnitt D.1.3.1, direkter Nachweis).

E.1.3 Geeignete Regionen des ZNS für Plasmidtransfektionen

Damit die *In-utero*-Elektroporation für weiterführende neurowissenschaftliche Forschungen angewendet werden kann, sollte ein Transfektionsatlas für das Großhirn im Mausmodell erstellt werden. Dieser Atlas beinhaltet die Hirnregionen, die durch die *In-utero*-Elektroporation transfiziert werden konnten. Weiterhin wurden benötigte Vorgaben wie Elektrodenwinkel, Injektionsvolumen, Embryonalstadium und Besonderheiten bei einzelnen Schritten der Transfektion angegeben. Forschungen am Großhirn von C57BL/6-Hintergrundstämmen sind durch die hier durchgeführte Etablierung standardisiert worden. Dadurch können in zukünftigen Arbeiten mit dieser Technik Tierzahlen und Leid der Tiere auf ein Minimum beschränkt werden. Außerdem können bei Nutzung der hier etablierten Standardprotokolle überregional vergleichende Analysen durchgeführt werden. So konnten die hier entworfenen Standardprotokolle für *In-vivo*-Transfektionen an mehreren Forschungsinstituten erfolgreich übertragen werden (u. a. am Institut für Molekulare und Zelluläre Anatomie, Universität Ulm, Deutschland, durch

Dr. Christoph Wiegrefe, oder am Department für Experimentelle Neurologie, Charité Berlin, Deutschland, durch Dr. Dr. Sebastian Schuchmann).

Zur Erstellung des Transfektionsatlasses wurden u. a. *In-utero*-Elektroporationen in verschiedenen kortikalen Bereichen der Großhirnanlage (siehe Abschnitt D.1.4.1) durchgeführt. Durch die hier erstellten Transfektionsdaten können in weiterführenden Experimenten mit dieser Technik die Erforschung von molekularbiologischen Signalkaskaden (z. B. Zhao et al. 2011), die Zellentwicklung (z. B. Prozorovski et al. 2008) und die Bildung von Netzwerkstrukturen (z. B. Brandt et al. 2007; Pacary et al. 2012) untersucht werden. Außerdem wäre es mit geeigneten Transfektionen möglich, migratorische Phänomene (z. B. Hatanaka et al. 2004), Gewebeschiedtentwicklungen (z. B. Kobayashi und Nakajima 2008) und Fehlbildungen (z. B. Ohshima et al. 2007) zu erschließen. Wie bei der *In-utero*-Elektroporation kortikaler Großhirnbereiche können Transfektionen in der Hippocampusformation (siehe Abschnitt D.1.4.2) für neuronale Zellstudien der Entstehung, Verschaltungen, Differenzierung und Migration angewendet werden (Nakahira und Yuasa 2005; Pacary et al. 2012). In dieser Arbeit erstellte Protokolle für *In-utero*-Elektroporationen der Hippocampusformation konnten in weiterführenden Studien in der Erforschung von Epilepsien angewendet werden (Trimbuch et al. 2009).

Erfolge in gezielten Zelltransfektionen einzelner Kernbereiche des Großhirns (siehe Abschnitt D.1.4.3) können durch gering traumatische Außenelektroden (z. B. Kataoka und Shimogori 2008) oder durch das Einstechen von Spitzenelektroden (Matsui et al. 2011) gewonnen werden. Die Transfektion von Kernbereichen eignet sich besonders gut zur Erforschung der Entwicklung und Funktion von Projektionen aus und in andere ZNS-Regionen (z. B. Torii und Levitt 2005; Tsuchiya et al. 2009). Außerdem können durch regionale Manipulationen molekularbiologische Aufschlüsse von Dysfunktionen und ihre Auswirkungen auf den Gesamtorganismus gezogen werden (Minati et al. 2011). Z. B. ist bekannt, dass genetische Defekte zur Degeneration von Nervenzellen im Putamen, einem Teilbereich des Striatums, führen können. Dieser neuronale Defekt wurde bei der Huntington-Krankheit festgestellt (Kwak 2002). Sich embryonal entwickelnde Projektionen zu kontralateralen Bereichen oder anderen Bereichen im ZNS sind wichtig für die Funktionsverschaltung und Reizverarbeitung innerhalb des neuronalen Netzwerkes. Fehlbildungen oder Unterbrechungen können verheerende Auswirkungen auf den Gesamtorganismus haben (Swayze et al. 1990; Brunjes et al. 1998).

Weiter sind Anwendungen der Technik für Transfektionen verschiedener embryonaler Regionen von anderen Forschern im Zeitraum der Erstellung der vorliegenden Arbeit veröffentlicht worden und können als ergänzende Methoden mit dem hier dargestellten Transfektionsatlas kombiniert werden. So können Zellmanipulationen, wie sie beim Thalamus und Hy-

pothalamus vorgestellt wurden, in weiteren Regionen des Dienzephalons durchgeführt werden (Dixit et al. 2011). Asuka Matsui (Labor für molekulare Mechanismen der Thalamus-Entwicklung, RIKEN Brain Science Institute, Japan) konnte Transfektionen in jüngeren Embryonalstadien durch Faseroptik kombiniert mit Stechelektroden ermöglichen (Matsui et al. 2011). Damit wären neben der mit Ultraschall gestützten *In-utero*-Elektroporation (Takahashi et al. 2002) Gentransfektionen in sehr jungen Embryonalstadien (ab E9, *p.c.*) möglich. Ebenfalls wurden Zellmanipulationen in der Retina (Punzo und Cepko 2008), im Kleinhirn (Okada et al. 2007), im Rückenmark (Saito 2006) und in skelettalen Muskelgruppen (Xiang et al. 2004) beschrieben. Eine Weiterführung der Technik stellt die Transfektion der Gehirnregionen in der adulten Maus dar. So konnte Jochen de Vry (Department für Psychiatrie und Neuropsychologie, Maastricht Universität, Maastricht, Niederlande) Plasmidtransfektionen in adulten Mausstadien durchführen, indem er die Grundlagen der *In-utero*-Elektroporation abwandelte und seiner Technik anpasste (de Vry et al. 2010).

Das Spektrum der Anwendungen von nicht infektiösen Transfektionen von Zellen durch die *In-utero*-Elektroporation erweiterte sich stetig seit den ersten Veröffentlichungen um das Jahr 2000 stetig. Dies zeigt auf, dass es sich um eine grundlegende Technik in der heutigen embryonalen Forschung handelt. Die hier vorgestellten Transfektionen unterschiedlicher Bereiche der embryonalen Großhirnanlage können in Kombination mit den bekannten Anwendungen dieser Technik in weiterführenden Forschungen beitragen.

E.1.4 Transfektion kortikaler Bereiche des dorso-lateralen Großhirns

Die radiale Migration, eine der 3 bekannten Arten der neuronalen Migration (Rakic 1995; Lois et al. 1996), wurde in den hier durchgeführten Versuchen untersucht.

Die Migration von Nervenzellen nach ihrer Entstehung aus Vorläuferzellen sind mit komplexen Mechanismen der Signaltransduktion, des Lipid-Phosphat-Haushalts der Zellen und mit den chemotaktischen und elektrophysiologischen Abläufen im Mikromilieu verbunden (siehe Kapitel B.3). So wurde z. B. postuliert, dass postmitotische Neurone nach ihrer Entstehung 4 Formen der Beeinflussung durch externe Faktoren unterliegen. Beispielsweise werden sie durch chemotaktische Faktoren aus den oberen Schichten des Kortex zur Migration gelenkt und gleichzeitig durch repulsive Faktoren in der ventrikulären Zone abgestoßen. In allen kortikalen Schichten befindliche pro-migratorische Faktoren unterstützen den Weg der Zellwanderung. Das Ende der neuronalen Migration wird durch Faktoren der äußeren Schichten eingeleitet (Zheng und Yuan 2008). Viele Komponenten der Ausrichtung zur Zellwanderung in der radialen Migration sind unbekannt oder noch unverstanden und bedürfen weitergehender Untersuchungen (Kanatani et al. 2005; Zhang et al. 2010). Die *In-utero*-Elektroporation eig-

net sich besonders gut zur Studie radialer Migrationsphänomene, da durch Gen- und damit verbundenen Proteinmanipulationen gezielte Auswirkungen innerhalb der Zelle und dem umliegenden Mikromilieu provoziert und analysiert werden können (Tabata und Nakajima 2001; Kobayashi und Nakajima 2008).

Die Technik der Histogrammanalyse fluoreszierender Proteine wurde für diese Arbeit aus bekannten Veröffentlichungen in der Tumorforschung übertragen (u. a. McMillan et al. 2009). Da keine bekannten Publikationen mit dieser Analysetechnik in Kombination mit der *In-utero*-Elektroporation existieren, wurde zu Beginn dieser Studie eine Standardisierung (Kontrolle) der Auswertungsmöglichkeit der radialen Migration mit Hilfe dieser Technik erstellt (Abschnitt D.1.5.1)

Es ist bekannt, dass zelluläre Migrationen im zerebralen Kortex durch Auszählungstechniken markierter Zellen (z. B. Feng et al. 2007) oder durch Nachverfolgung mit Videoaufnahmen (z. B. Nishimura et al. 2012) *in vivo* ausgewertet werden können. In der hier vorgestellten Arbeit wurden alle für *In-utero*-Transfektionen möglichen Embryonalstadien in Abständen von 24 Stunden Entwicklungszeit (E12-E17, *p.c.*) untersucht. Der somatosensorische Kortexbereich eignete sich aufgrund gut erkennbarer Schichtenbildung während der embryonalen Großhirnentwicklung und der gut zugänglichen Transfektion von Plasmiden über den Ventrikelraum als Etablierungsmodell. Zur Vergleichbarkeit zwischen den transfizierten Stadien wurden die erstellten Histogramme in prozentuale Abschnitte der detektierten Fluoreszenzsignale unterteilt (Abbildung 10). Damit konnten Durchschnittswerte der einzelnen Abschnitte des Querschnittes durch den dorsolateralen Neokortex berechnet werden. Mit Beendigung der embryonalen Phase (E18, *p.c.*) wurden die transfizierten Tiere ausgewertet. Damit konnte eine erste Übersicht der Zelltransfektionen in Abhängigkeit von der Zeit zwischen Transfektion und Analyse einzelner Embryonalstadien durchgeführt werden.

Aus den zuvor in dieser Arbeit gewonnenen Daten war bekannt, dass die Anzahl der Plasmid-tragenden Zellen durch Zellteilung der Vorläuferzellen mit zunehmender Transfektionsdauer anstieg (Abbildung 18). Dadurch und durch die gerichtete radiale Migration zu den äußeren Schichten der kortikalen Platte konnte davon ausgegangen werden, dass transfizierte Zellen jüngerer manipulierter Stadien (E12, *p.c.*) weiter von der ventrikulären Zone entfernt waren als bei Transfektionen späterer Stadien (E17, *p.c.*). Durch die Erstellung von Histogrammen über den Querschnitt des dorsolateralen Großhirnbereichs zwischen der ventrikulären und marginalen Zone konnte dieses Phänomen bestätigt werden (Abbildung 37). Damit war die Anwendung einer histogrammbasierenden Analyse fluoreszierender Zellen in unterschiedlichen Regionen von Geweben erfolgreich. Diese elektronische Erfassung von Fluoreszenzen in transfizierten Geweben können prinzipiell Fehler in der Datengewinnung minimieren oder ganz verhindern. So kann es z. B. zu keinen Fehlmessungen und Doppelzäh-

lungen kommen, wie sie bei manuellen Auszählungen von Zellkörpern und -ausläufern immer wieder vorkommen. Weiterhin kann die zeitintensive Mikroskopierarbeit reduziert werden, da die Detektion der Signale durch eine computergestützte Rasterauswertung erkannt und protokolliert wird. Ermüdungserscheinungen und folgende Unaufmerksamkeiten des Experimentators in der Auswertung können somit verhindert werden. Da aufgrund der Minimierung dieser Fehlerquellen mögliche Unterschiede in den Daten eher und deutlicher hervortreten, kann ebenfalls die nötige Anzahl der Versuchstiere für eine Analyse minimiert werden. Als Nachteil bei der computergestützten Analyse sind fehlerhafte immunhistologische Aufbereitungen der Schnitte zu bedenken. Fehlerhafte Fixationen sowie falsche Anwendungen von Fluoreszenzfärbeprotokollen können z. B. Artefakte in Form von deutlich erkennbaren Hintergrundrauschen (= positives Signal in den Zellen, die keine Transfektion erhalten haben) im Schnittbild hervorrufen. Dadurch würde bei der Histogrammanalyse eine falsch positive Fluoreszenz gemessen werden und es könnte zur Fehlinterpretation der Daten kommen. Aus diesem Grund müssen die Schnitte manuell vorselektiert werden.

Damit eine verbesserte Auswertungsstrategie der radialen Migration möglich ist, müssten die Transfektionen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien mit gleichbleibender Überlebenszeit der Embryonen respektive Jungtiere durchgeführt werden. Z. B. könnte man 12-17 Tage alte Embryonen manipulieren und 5 Tage postoperativ töten, um die radiale Migration in Abhängigkeit des Alters der Embryonen während der Transfektion zu analysieren. Gewebefixierungen und Analysen durch Histogramme nach solchen Transfektionen würden den radialen migratorischen Effekt besser zur Geltung bringen. So würde z. B. auch eine Transfektion im 12. Embryonalstadium mit einer 24 Stunden späteren Tötung des Tieres und anschließender Fixierung des Gewebes ähnliche Auswertungen wie Transfektionen mit E17-E18 (*p.c.*) in den Analysen der Histogramme ergeben. Die Verteilung der fluoreszierenden Zellen könnte auf diese Art und Weise im Gewebe verfolgt werden.

E.2 Einfluss des Proteins PRG-1 auf die radiale Migration im Neokortex

Durch Ergebnisse vorangegangener Funktionsanalysen von PRG-1 (Bräuer et al. 2003, Trimbuch et al. 2009) ist bekannt, dass dieses Protein eine wichtige Rolle bei der neuronalen synaptischen Verschaltung ausübt. Es wird vermutet, dass Lysophosphatidsäure (LPA) als bekannter Regulator in der Teilungsphase neuronaler Vorläuferzellen indirekt durch PRG-1 über den LPA-2-Rezeptor reguliert werden kann (Trimbuch et al. 2009). Das Fehlen des Proteins PRG-1 führt zur Erhöhung von LPA im synaptischen Spalt (Schlüter 2011). Bei höheren

Konzentrationen von LPA wird rezeptorspezifisch (LPA-Rezeptor) die intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöht, was Auswirkungen auf das Neuritenwachstum hat (Contos et al. 2002; Schlüter 2011). LPA im Überschuss kann z. B. bei jungen, postmitotischen Neuronen zu einer Neuritenrückbildung und Zellabrundung führen (Fukushima et al. 2000; Nurnberg et al. 2008). Ältere Neurone zeigten nach LPA-Erhöpfung einen Kollaps der Wachstumskegel (Fukushima et al. 2002). Dadurch wurde für diese Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass Manipulation an PRG-1 den LPA-Spiegel beeinflussen und Entwicklungs-, Migrations- und Differenzierungsphänotypen an postmitotischen Neuronen zur Folge haben kann. Manipulationen im Stadium E15 (*p.c.*) mit PRG-1-codierenden Plasmiden können mögliche Einflüsse auf das bis dahin in den Neuronen nur schwach exprimierte Protein deutlicher hervorheben. Neu generierte, postmitotische Neurone aus der Vorläuferzellschicht wandern in dieser Phase der Entwicklung, geleitet durch die Radialglia, in Richtung Marginalzone und bilden bis kurz nach der Geburt die 6 Zellschichten der kortikalen Platte des Großhirns aus (Gupta et al. 2002). Neurone, die durch Transfektionen in dieser Phase der Entwicklung markiert wurden, wandern in die oberen Schichten der kortikalen Platte des Neokortex (Taniguchi et al. 2012). Somit durchlaufen sie einen langen Migrationsweg von der ventrikulären Zone bis zum Zielort. Die etablierte Technik der *In-utero*-Elektroporation kann hier angewendet werden, um einen möglichen Einfluss von PRG-1 auf die zelluläre Migration im dorsolateralen Großhirnbereich zu untersuchen.

Wildtypmäuse, die einen natürlichen PRG-1-Proteinhaushalt während ihrer Entwicklung hatten, zeigten bei einer künstlich geschaffenen Überexpression von PRG-1 eine veränderte Verteilung der neuronalen Zellen im Neokortex. In der Nähe der ventrikulären Zone war eine höhere und in der kortikalen Platte eine geringere prozentuale Verteilung der PRG-1-überexprimierten Zellen vorzufinden (Abbildung 39). Da gezeigt werden konnte, dass PRG-1 für die Synaptogenese und damit in der Verschaltung sich differenzierender glutamaterger Neurone Bedeutung hat (Trimbuch et al. 2009), könnte eine Überexpression dieses Proteins zu einer schnelleren Differenzierung der transfizierten, postmitotischen Neurone geführt haben. Dieser höhere Differenzierungsgrad (Arimura und Kaibuchi 2007) kann eine fortführende Migration verhindern. Durch die Transfektion von Zellen in PRG-1-defizienten Tieren konnte diese Hypothese jedoch nicht unterstützt werden (Abbildung 40). Wenn ein höherer Differenzierungsgrad durch dieses Protein ausgelöst werden würde, wären bei defizienten PRG-1-Zellen weniger zelluläre Verschaltungen zu erwarten gewesen. Eine früher eingeleitete Netzwerkstruktur würde ausbleiben und in den zur Ventrikulärzone gerichteten Abschnitten wären prozentual weniger transfizierte Zellen, im Vergleich zu PRG-1-exprimierenden Zellen, vorzufinden.

Um diese Effekte des LPA-Einflusses in den hier entstandenen Ergebnissen mit einbinden zu können, sollen fortlaufende Versuche durch Transfektionen von LPA-Rezeptor-defizienten Mauslinien durchgeführt werden. LPA-1-Rezeptoren kommen wie LPA-2-Rezeptoren verstärkt in neuronalem Gewebe, speziell im Bereich der ventrikulären Zone, während der embryonalen Entwicklung vor (Contos et al. 2002). Beide Rezeptoren können durch LPA-Bindung die Rho-Signalkaskade aktivieren, was zur Neuritenrückbildung und Zellabrundung führen kann (Fukushima et al. 2001). Die Spezifität der Beteiligung möglicher LPA-Rezeptoren an dem erkannten migratorischen Phänomen von PRG-1 in dieser Arbeit könnte durch die geplanten Transfektionen der defizienten Tiere erkannt werden. Eine Überexpression von PRG-1 hatte auf das migratorische Verhalten und die daraus resultierende Querschnittsverteilung transfizierter Zellen im dorsolateralen Kortextbereich einen größeren Effekt, als bei defizienten Zellen für PRG-1 beobachtet werden konnte (Abbildung 39 und 40).

Ein zellulärer „knock out“ von PRG-1 sollte den Effekt des LPA-Einflusses verstärkt darstellen. Ein Cre-Rekombinase-codierendes Plasmid (*pCAG-Cre*) wurde dafür in konditionalen PRG-1-cko-Mäusen transfiziert. Dies hatte die zelluläre Ausschaltung von PRG-1 zur Folge (Abbildung 41). Hier zeigte sich eine Erhöhung der transfizierten Zellen in den Abschnitten 6-10 (ventrikuläre Zone bis Intermediärzone) gegenüber der Kontrolle. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass durch das Fehlen von PRG-1 der LPA-Spiegel im extrazellulären Raum steigt und es dadurch zu einer gestörten Migration der postmitotischen Neurone aufgrund einer LPA-bedingten Neuritenrückbildung, Zellabrundung (Fukushima et al. 2000; Nurnberg et al. 2008) oder eines Kollaps im Wachstumskegel (Fukushima et al. 2002) kommt. Bei einer solchen Transfektion ist zu beachten, dass die Cre-Rekombinase negative Effekte auf die Zelle ausüben kann. So zeigte eine erhöhte Expression der Cre-Rekombinase in Zellkulturen eine Verringerung des Zellwachstums und führte zu chromosomalen Aberrationen bis hin zum Zelltod (Loonstra et al. 2001; Pfeifer et al. 2001). *In vivo* können neuronale Proliferationen unterbunden werden sowie zytotoxische Effekte in Ependymzellen des ventrikulären Systems auftreten. Dadurch kann es z. B. zum Hydrozephalus kommen (Forni et al. 2006). Ein negativer Einfluss der zellulären Verteilung nach Transfektion mit einer Cre-Rekombinase im intakten Nervengewebe konnte ebenfalls in den hier beschriebenen Versuchen bestätigt werden (Anhang 4). So wurden im Vergleich in Kontrollgeweben, die keine Cre-Rekombinase exprimierten (*pCAG* in PRG-1-wt), geringere Verteilungen transfizierter Zellen in den Abschnitten zwischen der subventrikulären Zone bis zu den unteren Schichten der kortikalen Platte festgestellt. Mit dieser Analyse konnten jedoch keine Aussagen über eine erhöhte apoptotische Wirkung oder eine Hemmung der Proliferation durch die Cre-Rekombinase gezeigt werden. Damit eine Auswertung über eine erhöhte Zellsterblichkeit nach Cre-Transfektionen vorgenommen werden kann, müssten weitergehende Versuche mit durchflusszytometrischen Analysen erfolgen. So könnte nach einer Transfektion gleich-

zeitig die Markierung der Mitose (S-Phase) der Vorläuferzellen durch das Thymidinanalogon 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) erfolgen (Sauerzweig et al. 2009). Erst durch diese kalkulierbaren Ergebnisse könnten Artefakte in der Interpretation der erfolgten Transfektionen mit der Cre-Rekombinase in konditionalen PRG-1-cko-Embryonen ausgeschlossen werden. In weiterführenden Versuchen im Anschluss dieser Arbeit werden zu dieser Thematik die angesprochenen Analysen der Transfektionen durchgeführt.

E.3 Einfluss des Proteins LPP-1 und LPP-1a auf die radiale Migration im Neokortex

Die Expression von LPP-1a ist im Vergleich zu LPP-1 im Gehirn um das 10-fache höher (Velmans 2010), was diese Phosphatase interessant für gehirnspezifische Untersuchungen macht. Beide membranständigen Proteine werden bereits in sehr frühen Embryonalstadien der Maus (E14, *p.c.*), in der sich entwickelnden kortikalen Platte der Großhirnrinde sowie im Hippocampus, exprimiert (Gutsch 2007; Velmans 2010). Eine Manipulation von LPP durch *In-vivo*-Transfektion bewerkstelligte hier einen möglichen Erkenntnisgewinn in der Bedeutung dieser Phosphatasen für die Gehirnentwicklung. Der Vorteil der hier verwendeten zellulären Überexpression von LPP-1 und LPP-1a in einer Wildtypmaus ist die Durchführung von Untersuchungen ohne kompensatorische Regulationen des Phänotyps (Bai et al. 2003). Der Zeitpunkt der *In-utero*-Elektroporation wurde hierbei auf die Expressionsmuster von LPP im Mausgehirn abgestimmt.

In-vitro-Versuche zeigten, dass LPP-1 und LPP-1a in Neuronen, Astrozyten und Mikroglia exprimiert werden (Velmans 2010). Während der Embryogenese steigt die Expression beider Proteine fortwährend an. In der postnatalen und juvenilen Entwicklungsphase nimmt diese wieder ab. Mit Eintritt in das adulte Stadium kommt es erneut zu einem jedoch kurzen und schwächeren Anstieg der Expression. Aufgrund dieses Expressionsmusters und der bekannten Einflüsse von LPP-1 und LPP-1a auf den Lipid-Phosphat-Haushalt wurden *In-utero*-Elektroporationen an 15 Tage alten Embryonen der Wildtypmaus C57BL/6 durchgeführt (Abschnitt D.3). Weiter ermöglicht eine Transfektion der neuronalen Vorläuferzellschicht im ventrikulären und subventrikulären kortikalen Bereich der Großhirnanlage in diesem Stadium die Untersuchung von manipulierten postmitotischen Neuronen mit weiten migratorischen Wegen zum Zielort (Gupta et al. 2002). Einflüsse auf die Migration durch die Veränderung des Proteinhaushalts können bei solchen Transfektionen deutlich hervorgehoben werden.

Transfektionen in diesem Stadium mit einem LPP-1- und LPP-1a-herunterregulierenden Plasmid, dessen Funktionalität in Zellkulturversuchen verifiziert werden konnte (Gutsch

2007; Velmans 2010), zeigten, dass der prozentuale Anteil der transfizierten Zellen stetig von der Ventrikulärzone zur Marginalzone abnahm (Abbildung 42). Im Vergleich zur Kontrolle gab es dadurch geringere prozentuale Verteilungen in der Subventrikulär- und Intermediärzone. Dies deutet darauf hin, dass die Herunterregulation der Proteine LPP-1 und der Spleißvariante LPP-1a den Übergang der neu gebildeten postmitotischen Neurone in die kortikale Migration hemmt und somit ein Großteil dieser Neurone in der Vorläuferzellschicht verblieben war.

Diese Vermutung wird durch bereits veröffentlichte Ergebnisse von *In-utero*-Elektroporationen mit bis zu 7 Tage längeren Transfektionszeiten untermauert (Gutsch 2007; Velmans 2010). In diesen Transfektionen kam es ebenfalls zu einem verspäteten Übergang der neu generierten postmitotischen Zellen aus der ventrikulären und subventrikulären Zone, welche sich in einem vorzeitigen Ende der Migration mit anschließender Differenzierung der Neurone in den tieferen Schichten der kortikalen Platte darstellte.

Durch die Kooperation mit Dr. Arne Battefeld (Institut für Zell- und Neurobiologie, Charité Berlin, Deutschland) konnten elektrophysiologische Ableitungen der Transfektionen mit LPP-1- und LPP-1a-herunterregulierenden Plasmiden durchgeführt werden. Die elektrische Aktivität ist hierbei bekanntermaßen wichtig für Entwicklung (Spitzer 2006) und Migration (de Marco Garcia et al. 2011) von Neuronen. Die elektrophysiologischen Messungen zeigten, dass die spannungsabhängigen einwärtsgerichteten Ströme in Zellen mit verminderter LPP-Expression im Vergleich zu normal exprimierenden Kontrollzellen verringert waren (Battefeld 2012). Weiterhin konnte damit festgestellt werden, dass Neurone in denen LPP-1 und LPP-1a herunterreguliert wurde, welche in den unteren Schichten vorzeitig ausdifferenzierten, die gleichen elektrophysiologischen Zelleigenschaften hatten wie nicht transfizierte Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft (Battefeld 2012). Somit haben die Neurone, die ursprünglich in Schicht II/III der kortikalen Platte wandern sollten, einen Wechsel des Zellphänotyps erworben. Damit konnte gezeigt werden, dass das Mikromilieu ausschlaggebend für die Differenzierung der Zellen ist (Haeusler und Maass 2007) und durch eine Runterregulation von LPP-1 und LPP-1a in postmitotischen Neuronen eine Veränderung provoziert werden kann. Mittels der hier beschriebenen elektrophysiologischen Messungen konnte nicht geklärt werden, ob der migratorische Phänotyp durch LPA induziert wurde (Battefeld 2012). Um diese Frage abschließend zu klären, werden zukünftig weiterführende Transfektionsexperimente mit LPA-1- und LPA-2-Rezeptor-defizienten Mäusen durchgeführt. Sollte diese Tiere bei Herunterregulation von LPP keinen veränderten Migrationsphänotyp zeigen, würde dies die Hypothese bestätigen, da der erhöhte LPA-Spiegel durch die nicht vorhandenen Rezeptoren keinen Effekt hervorrufen könnte.

Histologische Untersuchungen zeigten, dass das Migrationsdefizit transfizierter Neurone nicht mit Veränderungen der Strukturen des Radialgliazernetzwerkes oder der Zellmorphologie erklärt werden konnte (Velmans 2010). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist die eingeschränkte Phosphataseaktivität LPP-1- und LPP-1a-herunterregulierter Zellen, wodurch eine veränderte Signaltransduktion hervorgerufen werden könnte. Es ist bekannt, dass LPA gekoppelt an LPA-Rezeptoren (primär LPA-1- und LPA-2-Rezeptoren in Neuronen) G-protein-gesteuerte Signalkaskaden (G_q -, $G_{12/13}$ - und G_i -Protein) aktivieren kann (Mills und Moolenaar 2003). In Gewebekulturexperimenten führte eine Erhöhung von LPA zur Zellabrundung und Rückbildung der Zellausläufer (Fukushima et al. 2000). Somit könnte durch die fehlende Dephosphorylierung von LPP-1 und LPP-1a bedingte Akkumulation von LPA zu einer Rückbildung von Zellausläufern und Abrundung des Zellsoma führen und somit die Zellen in ihrer Migration hemmen. Eine weitere mögliche Erklärung für den beobachteten Phänotyp ist (Abbildung 42), dass eine Herunterregulation von LPP-1 und LPP-1a die Sphingosin-1-Phosphate im zellulären Milieu erhöhen kann. Hierdurch könnten überschneidende G-Protein-Signalkaskaden, die einen Zellumbau mit Neuritenrückbildung und Zellabrundung einleiten, eingeleitet worden sein (Soliven et al. 2011). Diese Hypothese soll zukünftig in massenspektrometrischen Untersuchungen überprüft werden.

Durch eine Transfektion mit heraufregulierenden LPP-1- und LPP-1a-Plasmiden zeigte sich unerwarteterweise ein ähnlicher Phänotyp in der Verteilung transfizierter Zellen wie bei der Herunterregulation dieser membranständigen Proteine (Abbildung 43 B und Abbildung 44 B). Die größte Verteilung der transfizierten Zellen war im Bereich der Ventrikulärzone zu finden und die prozentuale Anzahl LPP-1- und LPP-1a-transfizierter Zellen nahm zur Marginalzone stetig ab. Hypothetisch wurde erwartet, dass LPP-1- und LPP-1a-Transfektionen das Mikromilieu der bioaktiven Lipid-Phosphate so verändern, dass die hier transfizierten Zellen weiter Richtung Marginalzone migrieren als die Kontrollen. Eine Erklärung für diese scheinbar widersprüchlichen Befunde ist, dass die verstärkte Bildung von LPP-1 und LPP-1a die Zellen schädigt. In der mikroskopischen Analyse zeigte sich dementsprechend, dass weniger Zellen, die mit LPP-1 oder LPP-1a transfiziert wurden, Fluoreszenzen tragen als in den Kontrollen (Abbildung 43 B und Abbildung 44 B). Dies könnte durch eine erhöhte Apoptoserate, die durch die Belastung der Transfektion oder durch die Auswirkungen eines erhöhten Proteinspiegels von LPP-1 und LPP-1a verursacht wird, erklärt werden. Vor allem, da bekannt ist, dass durch einen erhöhten Proteinspiegel stressbedingt in den Zellen die Apoptose eingeleitet werden kann. Beispielsweise führt die Akkumulation von nicht gefalteten Proteinen bei einer verstärkten Expression im endoplasmatischen Retikulum zu Stress der Zelle, was deren Apoptose auslösen kann (Wang et al. 2012).

LPP-1 und LPP-1a spielen somit nachgewiesenerweise eine nicht zu unterschätzende Rolle bei der korrekten Ausbildung von neuronalen Strukturen während der Entwicklung des Gehirns. Die genauen Zusammenhänge sind dabei bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt und bedürfen weitergehende Untersuchungen, in der die *In-utero*-Elektroporation einen entscheidenden Faktor zum Erkenntnisgewinn beitragen kann.

F Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation beschreibt neue Aspekte in der Entwicklung der Methode der *In-utero*-Elektroporation (IUE) und nimmt dabei Bezug auf die Neurogenese und die kortikale Migration im zentralen Nervensystem. Mithilfe der beschriebenen Transfektionstechnik konnte durch Regulation der Expression definierter Proteine die Entwicklung neuronaler Stammzellen im Iso- und Allokokortex manipuliert werden.

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurden die Funktionalität und die Aussagekraft dieser Manipulationen in der C57BL/6-Wildtypmaus in unterschiedlichen Embryonalstadien zwischen E12 bis E17 untersucht. Weiter wurden die Standardwerte der Elektroporation und Transfektion definiert. Dabei wurden unterschiedliche Plasmide *in vitro* und *in vivo* getestet und nötige Spannungswerte und Injektionsstellen für eine erfolgreiche Transfektion untersucht. Der Erfolg konnte durch fluoreszierende Signale und die Anzahl transfizierter Zellen gemessen werden.

Für die Durchführung der *In-utero*-Elektroporation wurden die operativen Parameter mit der geringsten Letalität, aber einer hohen Effektivität der Transfektion von Embryonen bestimmt. Zur weiterführenden Analyse mithilfe der *In-utero*-Elektroporation wurden mögliche Transfektionsregionen in dem C57BL/6-Mausmodell erschlossen und ein Atlas mit den Elektrodenwinkeln zur Transfektion unterschiedlicher Großhirnbereiche erstellt.

Transfektionen mit 2 unterschiedlichen Plasmiden im selben Embryo konnten ebenfalls erfolgreich durchgeführt werden. Es zeigte sich dabei, dass die *In-utero*-Elektroporation in unterschiedlichen Hemisphären ideal für den Vergleich der Auswirkungen der transfizierten Plasmide genutzt werden kann. Hingegen stellt die Transfektion zweier unterschiedlicher Plasmide in derselben Hemisphäre eine optimale Analysemethode für das Zusammenspiel der codierten Proteine dar.

Zur Analyse kortikaler Migrationen wurde in dieser Arbeit erstmalig die Histogrammanalyse nach *In-utero*-Elektroporation angewendet. Dazu wurden somatosensorische Kortexbereiche des Großhirns in unterschiedlichen Embryonalstadien manipuliert und die Ergebnisse in der Verteilung der fluoreszierenden Signale und der transfizierten Zellkörper verglichen. Es zeigte sich, dass die Verteilung der manipulierten Zellkörper, die durch Auszählung erfasst wurden, mit Histogrammberechnungen der Fluoreszenzen im Gewebeschnitt bei Transfektionen im letzten Viertel der Trächtigkeit gleiche oder annähernd ähnliche Ergebnisse erbrachten. Dieses neue Auswerteverfahren der neuronalen Migration durch Histogrammanalysen wurde

in der hier vorgestellten Arbeit bei 2 wichtigen membranständigen Proteinen, dem PRG-1 und LPP-1 mit der Spleißvariante LPP-1a erfolgreich getestet.

Bei der Erforschung molekularer Einflüsse in der Regulation des axonalen Auswachsens in der Hippocampusformation wurde das PRG-1 als beteiligtes Membranprotein vor einigen Jahren entdeckt. In dieser Dissertation wurde erstmalig die Migration neuronaler postmitotischer Zellen im somatosensorischen Kortextbereich des Großhirns unter Beeinflussung der Expression des membranständigen Proteins PRG-1 in der Embryonalphase untersucht. Dabei zeigte sich, dass bei einer verstärkten Produktion des Proteins durch gentechnische Veränderungen in den Vorläuferzellen mithilfe der *In-utero*-Elektroporation weniger transfizierte postmitotische Zellen im Vergleich zur Kontrolle in der kortikalen Platte aufzufinden waren. Der Großteil der transfizierten Zellen, die PRG-1 überexprimierten, waren in der ventrikulären und subventrikulären Zone vorzufinden. Bei einer zellulären Defizienz von PRG-1 waren nur wenige transfizierte, postmitotische Neurone in der Übergangsphase zwischen der subventrikulären und intermediären Zone. Dies stellt den Beginn der radialen Migration dar. Obwohl PRG-1 keine bekannte enzymatische Aktivität besitzt, zeigte sich der Hinweis, dass PRG-1 eine regulatorische Funktion in der Migration postmitotischer Neurone haben könnte.

Im letzten Abschnitt dieser Arbeit wurde der Einfluss der Transfektion von LPP-1- und LPP-1a-codierenden Plasmiden auf die Neurogenese und die neuronale Migration untersucht. Beide Proteine dephosphorylieren aktiv Lipid-Phosphate und sind für die Entwicklung des zerebralen Kortext und die funktionelle Reifung der Neurone wichtig. Im Zuge dieser Arbeit zeigte sich, dass sowohl eine Herunter- als auch eine Heraufregulation von LPP-1 und LPP-1a zu einer annähernd gleichen Verteilung der transfizierten Zellen im somatosensorischen Kortext im Vergleich zur Kontrolle führte. Dies kann ein Hinweis sein, dass die Balance der Stoffwechselproduktkonzentrationen (LPA, S-1-P, C-1-P und LP) von LPP-1 und LPP-1a im Mikromilieu der umgebenen Zellen für die neuronale Migration postmitotischer Neurone im somatosensorischen Kortext von Bedeutung ist.

G Summary

Title: Establishment of the *in-utero* electroporation of the central nervous system in the C57BL/6 mouse model

Jan Baumgart

This thesis describes new aspects in the development of the *in-utero* electroporation method (IUE) and hereby refers to the neurogenesis and the cortical migration in the central nervous system. With the assistance of the described transfection technique the development of neuronal stem cells could be manipulated in iso- and allocortex by regulating the expression of defined plasmids.

The first section of this thesis examines the functionality and the validity of the IUE in the C57BL/6 wildtype mouse in different embryonic stages between E12 and E17. Next were defined standard values for electroporation and transfection. In the process, various plasmids were tested *in vitro* and *in vivo* and necessary voltages and injection points examined for a successful transfection. The success could be measured with fluorescent signals and the number of transfected cells.

The operative parameters with the least lethality but a high effectiveness of the transfections of embryos were determined for the execution in the *in-utero* electroporation. An atlas for transfection of various brain regions with the corresponding electrode angles was developed in the C57BL/6 mouse model.

Transfections with 2 different plasmids in the same embryo were also executed successfully. This showed that the *in-utero* electroporation in different hemispheres can be ideally utilised to compare the effects of the transfected plasmids. However, the transfection of two different plasmids in the same hemisphere represents an optimal analysis of the interaction of the encoded proteins.

In order to analyse cortical migration, histogram evaluations after *in-utero* electroporation was used for the first time in this project. For this purpose, somatosensory cortex regions of the cerebrum were manipulated in various embryonic stages and the results in the distribution of the fluorescent signals and the transfected cell bodies compared. It became evident that the distribution of the manipulated cell bodies captured by the count provided the same or similar results in the last quarter of gestation with histogram calculations of the fluorescence in the tissue section at transfections. This new analysis procedure of the neuronal migration through histogram analyses was successfully tested in this dissertation on two neu-

ronal cell membrane proteins, namely the PRG-1 and the LPP-1 with splicing variation LPP-1a.

PRG-1 was discovered as participating membrane protein some years ago during the research of molecular impacts in the regulation of the axonal outgrowth in the hippocampus formation. For the first time, this dissertation examined the migration of neuronal post-mitotic cells in the somatosensory cortex region of the cerebrum, influencing the membrane protein PRG-1 in the embryonic phase. Overexpression of PRG-1 in progenitor cells via *in-utero*-electroporation reduced the number of postmitotic cells in the cortical plate. The majority of the transfected cells, that over-expressed PRG-1, could be found in the ventricular and sub-ventricular zone. Only few transfected post-mitotic neurones were between the sub-ventricular and intermediary zone in the transition phase at a cellular deficiency of PRG-1, which represents the beginning of the radial migration. Even though PRG-1 does not possess any known enzymatic activity, there were indications that PRG-1 could have a regulatory function in the migration of post-mitotic neurones.

The impact of neurogenesis and neuronal migration, caused by the transfection of LPP-1 and LPP-1a encoded plasmids, was examined in the last section of this dissertation. Both proteins dephosphorylate active lipid phosphates and are important for the development of the cerebral cortex with the functional maturing of the neurones. It was determined that down- as well as a upregulation of these proteins only resulted in an almost similar distribution of the transfected cells when compared to the control. This could be an indication that the balance of the metabolic product concentration (LPA, S-1-P, C-1-P and LP) of LPP-1 and LPP-1a is of significance for the neuronal migration of post-mitotic neurones in the somatosensory cortex in the micro-milieu of the surrounding cells.

H Zitierte Literatur

- Akamatsu, W., H. J. Okano, N. Osumi, et al. (1999). „Mammalian ELAV-like neuronal RNA-binding proteins HuB and HuC promote neuronal development in both the central and the peripheral nervous systems.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(17): 9885–9890.
- Alvarez-Buylla, A., J. M. Garcia-Verdugo und A. D. Tramontin (2001). „A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells.“ *Nature reviews. Neuroscience* 2(4): 287–293.
- Anderson, S. A., D. D. Eisenstat, L. Shi, et al. (1997). „Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on Dlx genes.“ *Science* 278(5337): 474–476.
- Angevine, J. B., Jr. und R. L. Sidman (1961). „Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse.“ *Nature* 192: 766–768.
- Arimura, N. und K. Kaibuchi (2007). „Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms.“ *Nature reviews. Neuroscience* 8(3): 194–205.
- Ayala, R., T. Shu und L. H. Tsai (2007). „Trekking across the brain: the journey of neuronal migration.“ *Cell* 128(1): 29–43.
- Ayuni, E. L., A. Gazdhar, M. N. Giraud, et al. (2010). „In vivo electroporation mediated gene delivery to the beating heart.“ *PloS one* 5(12): e14467.
- Bai, J., R. L. Ramos, J. B. Ackman, et al. (2003). „RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex.“ *Nature neuroscience* 6(12): 1277–1283.
- Baldi, L., N. Muller, S. Picasso, et al. (2005). „Transient gene expression in suspension HEK-293 cells: application to large-scale protein production.“ *Biotechnology progress* 21(1): 148–153.
- Battefeld, A. (2012). „Neuromodulatory actions of lysophosphatidic acid in vitro – a mouse study.“ *Universitätsbibliothek Freie Universität Berlin DDC 570 Biowissenschaften: IX, 102 S.*
- Baumgart J. und N. Grebe (2015). „C57BL/6-specific conditions for efficient in utero electroporation of the central nervous system.“ *Journal of Neuroscience Methods* 240: 116–124.

- Bayer, J. A. und J. Altman (1991). "Neocortical Development", Raven Press. Universität von Michigan. ISBN: 0881677787. 255 Seiten
- Ben-Ari, Y. (2006). „Basic developmental rules and their implications for epilepsy in the immature brain.“ *Epileptic disorders: international epilepsy journal with videotape* 8(2): 91–102.
- Bill, B. R. und D. H. Geschwind (2009). „Genetic advances in autism: heterogeneity and convergence on shared pathways.“ *Current opinion in genetics & development* 19(3): 271–278.
- Bockmann, R. A., B. L. de Groot, S. Kakorin, et al. (2008). „Kinetics, statistics, and energetics of lipid membrane electroporation studied by molecular dynamics simulations.“ *Biophysical journal* 95(4): 1837–1850.
- Borrell, V., Y. Yoshimura und E. M. Callaway (2005). „Targeted gene delivery to telencephalic inhibitory neurons by directional in utero electroporation.“ *Journal of neuroscience methods* 143(2): 151–158.
- Bosch, T. C., R. Augustin, K. Gellner, et al. (2002). „In vivo electroporation for genetic manipulations of whole Hydra polyps.“ *Differentiation; research in biological diversity* 70(4–5): 140–147.
- Boutin, C., S. Diestel, A. Desoeuvre, et al. (2008). „Efficient in vivo electroporation of the postnatal rodent forebrain.“ *PloS one* 3(4): e1883.
- Brandt, N., K. Franke, M. R. Rasin, et al. (2007). „The neural EGF family member CALEB/NGC mediates dendritic tree and spine complexity.“ *The EMBO journal* 26(9): 2371–2386.
- Bräuer, A. U. und R. Nitsch (2008). „Plasticity-related genes (PRGs/LRPs): a brain-specific class of lysophospholipid-modifying proteins.“ *Biochimica et biophysica acta* 1781(9): 595–600.
- Bräuer, A. U., N. E. Savaskan, H. Kuhn, et al. (2003). „A new phospholipid phosphatase, PRG-1, is involved in axon growth and regenerative sprouting.“ *Nature neuroscience* 6(6): 572–578.
- Brindley, D. N. (2004). „Lipid phosphate phosphatases and related proteins: signaling functions in development, cell division, and cancer.“ *Journal of cellular biochemistry* 92(5): 900–912.

- Brindley, D. N. und C. Pilquil (2009). „Lipid phosphate phosphatases and signaling.“ *Journal of lipid research* 50 Suppl: S225–230.
- Brindley, D. N., C. Pilquil, M. Sariahmetoglu, et al. (2009). „Phosphatidate degradation: phosphatidate phosphatases (lipins) and lipid phosphate phosphatases.“ *Biochimica et biophysica acta* 1791(9): 956–961.
- Brindley, D. N. und D. W. Waggoner (1998). „Mammalian lipid phosphate phosphohydrolases.“ *The Journal of Biological Chemistry* 273(38): 24281–24284.
- Brunjes, P. C., M. Fisher und R. Grainger (1998). „The small-eye mutation results in abnormalities in the lateral cortical migratory stream.“ *Brain research. Developmental brain research* 110(1): 121–125.
- Bullock, T. H. (1959). „Neuron doctrine and electrophysiology.“ *Science* 129(3355): 997–1002.
- Burn, S. F. (2012). „Detection of beta-galactosidase activity: X-gal staining.“ *Methods in molecular biology* 886: 241–250.
- Carpenter, M. K., X. Cui, Z. Y. Hu, et al. (1999). „In vitro expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells.“ *Experimental Neurology* 158(2): 265–278.
- Caviness, V. S., Jr., T. Takahashi und R. S. Nowakowski (1995). „Numbers, time and neocortical neuronogenesis: a general developmental and evolutionary model.“ *Trends in Neuroscience* 18(9): 379–383.
- Checiu, M., D. Amels, S. Sandor et al. (1977). „Contributions to the transfer of preimplantation mouse embryos into „foster-mothers“.“ *Morphologie et embryologie* 23(3): 175–180.
- Chen, J. G., M. R. Rasin, K. Y. Kwan, et al. (2005). „Zfp312 is required for subcortical axonal projections and dendritic morphology of deep-layer pyramidal neurons of the cerebral cortex.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(49): 17792–17797.
- Choi, B. H. und M. Kudo (1981). „Abnormal neuronal migration and gliomatosis cerebri in epidermal nevus syndrome.“ *Acta neuropathologica* 53(4): 319–325.
- Cline, H. T. (2001). „Dendritic arbor development and synaptogenesis.“ *Current Opinion in Neurobiology* 11(1): 118–126.

- Contos, J. J., I. Ishii, N. Fukushima, et al. (2002). „Characterization of Ipa(2) (Edg4) and Ipa(1)/Ipa(2) (Edg2/Edg4) lysophosphatidic acid receptor knockout mice: signaling deficits without obvious phenotypic abnormality attributable to Ipa(2).“ *Molecular and cellular biology* 22(19): 6921–6929.
- Curran, T. und G. D’Arcangelo (1998). „Role of reelin in the control of brain development.“ *Brain research. Brain research reviews* 26(2–3): 285–294.
- D’Udine, B. und S. Gozzo (1983). „Archicortex and neocortex in the precocial murid *Acomys cahirinus*. A comparison with two altricial species: *Mus musculus* and *Rattus norvegicus*.“ *The International journal of neuroscience* 20(3–4): 255–263.
- Dailey, M. E. und S. J. Smith (1996). „The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices.“ *Journal of Neuroscience* 16(9): 2983–2994.
- dal Maschio, M., D. Ghezzi, G. Bony, et al. (2012). „High-performance and site-directed in utero electroporation by a triple-electrode probe.“ *Nature communications* 3: 960.
- Danielian, P. S., D. Muccino, D. H. Rowitch, et al. (1998). „Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase.“ *Current Biology* 8(24): 1323–1326.
- Jacobowitz, L. C. A., Ed. (1997). *Chemoarchitectonic Atlas of the Developing Mouse Brain*, CRC Press. ISBN: 0849326672. 304 Seiten
- Davis, R. A. (1968). „Induction of fatal hypothermia in house-mice.“ *The Annals of applied biology* 61(2): 326–330.
- de Kloet, E. R., R. M. Sibug, F. M. Helmerhorst, et al. (2005). „Stress, genes and the mechanism of programming the brain for later life.“ *Neuroscience and biobehavioral reviews* 29(2): 271–281. Erratum (2006). 30(4): 576. Schmidt, Mathias [corrected to Schmidt, Mathias V]
- de la Rosa, E. J. und F. de Pablo (2000). „Cell death in early neural development: beyond the neurotrophic theory.“ *Trends in neurosciences* 23(10): 454–458.
- de Marco Garcia, N. V., T. Karayannis und G. Fishell (2011). „Neuronal activity is required for the development of specific cortical interneuron subtypes.“ *Nature* 472(7343): 351–355.
- de Melo, J. und S. Blackshaw (2011). „In vivo electroporation of developing mouse retina.“ *Journal of visualized experiments* (52): pii 2847.

- de Vry, J., P. Martinez-Martinez, M. Losen, et al. (2010). „In vivo electroporation of the central nervous system: a non-viral approach for targeted gene delivery.“ *Progress in neurobiology* 92(3): 227–244.
- DeFrance, J. F., T. Shimono und S. T. Kitai (1972). „Hippocampal inputs to the lateral septal nucleus: patterns of facilitation and inhibition.“ *Brain research* 37(2): 333–339.
- Del Bene, F., A. M. Wehman, B. A. Link, et al. (2008). „Regulation of neurogenesis by interkinetic nuclear migration through an apical-basal notch gradient.“ *Cell* 134(6): 1055–1065.
- Deng, J. B., D. M. Yu und M. S. Li (2006). „Formation of the entorhino-hippocampal pathway: a tracing study in vitro and in vivo.“ *Neuroscience bulletin* 22(6): 305–314.
- Devoto, S. H. (1990). „Neuronal growth cone migration.“ *Experientia* 46(9): 916–922.
- Dixit, R., F. Lu, R. Cantrup, et al. (2011). „Efficient gene delivery into multiple CNS territories using in utero electroporation.“ *Journal of visualized experiments* (52).
- Doetsch, F. und A. Alvarez-Buylla (1996). „Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(25): 14895–14900.
- Doetsch, F., I. Caille, D. A. Lim, et al. (1999). „Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain.“ *Cell* 97(6): 703–716.
- Doetsch, F., J. M. Garcia-Verdugo und A. Alvarez-Buylla (1997). „Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain.“ *Journal of Neuroscience* 17(13): 5046–5061.
- Echeverri, K. und E. M. Tanaka (2003). „Electroporation as a tool to study in vivo spinal cord regeneration.“ *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 226(2): 418–425.
- Escalante-Alcalde, D., L. Hernandez, H. Le Stunff et al. (2003). „The lipid phosphatase LPP3 regulates extra-embryonic vasculogenesis and axis patterning.“ *Development* 130(19): 4623–4637.
- Farah, C. A., D. Liazoghli, S. Perreault, et al. (2005). „Interaction of microtubule-associated protein-2 and p63: a new link between microtubules and rough endoplasmic reticulum membranes in neurons.“ *The Journal of Biological Chemistry* 280(10): 9439–9449.

- Feng, L., N. S. Allen, S. Simo, et al. (2007). „Cullin 5 regulates Dab1 protein levels and neuron positioning during cortical development.“ *Genes & development* 21(21): 2717-2730.
- Forni, P. E., C. Scuoppo, I. Imayoshi, et al. (2006). „High levels of Cre expression in neuronal progenitors cause defects in brain development leading to microencephaly and hydrocephaly.“ *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 26(37): 9593–9602.
- Franke, K., W. Otto, S. Johannes, et al. (2012). „miR-124-regulated RhoG reduces neuronal process complexity via ELMO/Dock180/Rac1 and Cdc42 signalling.“ *The EMBO journal* 31(13): 2908–2921.
- Friedrich, G. und P. Soriano (1991). „Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice.“ *Genes and Development* 5(9): 1513–1523.
- Frotscher, M., K. Scharmacher und M. Scharmacher (1978). „Relationship between the environment and pyramidal neuron differentiation in the hippocampus (CA 1) of the rat. Differentiation of apical lateral and basal dendrites.“ *Journal für Hirnforschung* 19(5): 445–456.
- Fukuchi-Shimogori, T. und E. A. Grove (2001). „Neocortex patterning by the secreted signaling molecule FGF8.“ *Science* 294(5544): 1071–1074.
- Fukushima, N., I. Ishii, J. J. Contos, et al. (2001). „Lysophospholipid receptors.“ *Annual review of pharmacology and toxicology* 41: 507–534. Erratum (2002). 42:vii.
- Fukushima, N., I. Ishii, Y. Habara, et al. (2002). „Dual regulation of actin rearrangement through lysophosphatidic acid receptor in neuroblast cell lines: actin depolymerization by Ca(2+)-alpha-actinin and polymerization by rho.“ *Molecular Biology of the Cell* 13(8): 2692–2705.
- Fukushima, N., J. A. Weiner und J. Chun (2000). „Lysophosphatidic acid (LPA) is a novel extracellular regulator of cortical neuroblast morphology.“ *Developmental biology* 228(1): 6–18.
- Fukushima, N., J. A. Weiner, D. Kaushal, et al. (2002). „Lysophosphatidic acid influences the morphology and motility of young, postmitotic cortical neurons.“ *Molecular and cellular neurosciences* 20(2): 271–282.

- Gadisseux, J. F., H. J. Kadhim, P. van den Bosch de Aguilar, et al. (1990). „Neuron migration within the radial glial fiber system of the developing murine cerebrum: an electron microscopic autoradiographic analysis.“ *Developmental Brain Research* 52(1–2): 39–56.
- Gaiano, N., J. D. Kohtz, D. H. Turnbull, et al. (1999). „A method for rapid gain-of-function studies in the mouse embryonic nervous system.“ *Nature Neuroscience* 2(9): 812–819.
- Gambello, M. J., S. Hirotsune und A. Wynshaw-Boris (1999). „Murine modelling of classical lissencephaly.“ *Neurogenetics* 2(2): 77–86.
- Gazdhar, A., M. Bilici, J. Pierog, et al. (2006). „In vivo electroporation and ubiquitin promoter-a protocol for sustained gene expression in the lung.“ *The Journal of Gene Medicine* 8(7): 910–918.
- Gierdalski, M. und S. L. Juliano (2002). „Influence of radial glia and Cajal-Retzius cells in neuronal migration.“ *Results and problems in cell differentiation* 39: 75–88.
- Götz, M. und W. B. Huttner (2005). „The cell biology of neurogenesis.“ *Nature reviews. Molecular cell biology* 6(10): 777–788.
- Götz, M. und L. Sommer (2005). „Cortical development: the art of generating cell diversity.“ *Development* 132(15): 3327–3332.
- Gould, E., B. S. McEwen, P. Tanapat, et al. (1997). „Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and nMDA receptor activation.“ *The Journal of Neuroscience* 17(7): 2492–2498.
- Guedel, A.E. (1951). „Inhalational Anaesthesia. A Fundamental Guide.“ 2. Auflage, New York: The Macmillan Company, Seite 172 ff
- Gupta, A., L. H. Tsai und A. Wynshaw-Boris (2002). „Life is a journey: a genetic look at neocortical development.“ *Nature reviews. Genetics* 3(5): 342–355.
- Gupta, S. K. und T. Sharma (2009). „Acute post-traumatic hydrocephalus in an infant due to aqueductal obstruction by a blood clot: a case report.“ *Child’s nervous system: ChNS: official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery* 25(3): 373–376.
- Gutsch, R. (2007). „Morphologische und funktionelle Analysen von LPP-1 und LPP-1a im ZNS.“ Technische Fachhochschule Berlin: Studiengang Biotechnologie: 72.

- Hack, I., M. Bancila, K. Loulier, et al. (2002). „Reelin is a detachment signal in tangential chain-migration during postnatal neurogenesis.“ *Nature Neuroscience* 5(10): 939–945.
- Haeusler, S. und W. Maass (2007). „A statistical analysis of information-processing properties of lamina-specific cortical microcircuit models.“ *Cerebral cortex* 17(1): 149–162.
- Harris, K. M. und J. K. Stevens (1989). „Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics.“ *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 9(8): 2982–2997.
- Harrison, P. J. und D. R. Weinberger (2005). „Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence.“ *Molecular psychiatry* 10(1): 40–68; image 45. Errata (2005). April;10(4):420 und August;10(8):804.
- Hatanaka, Y., S. Hisanaga, C. W. Heizmann, et al. (2004). „Distinct migratory behavior of early- and late-born neurons derived from the cortical ventricular zone.“ *The Journal of comparative neurology* 479(1): 1–14.
- Holland, P. J., A. M. George, L. T. Worrell, et al. (2012). „In vitro electroporation of the lower rhombic lip of midgestation mouse embryos.“ *Journal of visualized experiments* (66): e3983.
- Hooks, S. B., S. P. Ragan und K. R. Lynch (1998). „Identification of a novel human phosphatidic acid phosphatase type 2 isoform.“ *FEBS Letters* 427(2): 188–192.
- Horwitz, A. R. und J. T. Parsons (1999). „Cell migration--movin' on.“ *Science* 286(5442): 1102–1103.
- Hu, H. (2000). „Polysialic acid regulates chain formation by migrating olfactory interneuron precursors.“ *Journal of Neuroscience Research* 61(5): 480–492.
- Huang, Y. F., W. C. Chen, J. J. Tseng, et al. (2006). „Fetal intracranial hemorrhage (fetal stroke): report of four antenatally diagnosed cases and review of the literature.“ *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology* 45(2): 135–141.
- Huitema, K., J. van den Dikkenberg, J. F. Brouwers, et al. (2004). „Identification of a family of animal sphingomyelin synthases.“ *The EMBO journal* 23(1): 33–44.

- Huttunen, M. O. (1997). „Schizophrenia as a fetal developmental disorder of the central nervous system.“ *Duodecim; laaketieteellinen aikakauskirja* 113(24): 2593–2594.
- Ihrie, R. A. und A. Alvarez-Buylla (2008). „Cells in the astroglial lineage are neural stem cells.“ *Cell and Tissue Research* 331(1): 179–191.
- Imamura, F. und C. A. Greer (2013). „Pax6 regulates Tbr1 and Tbr2 expressions in olfactory bulb mitral cells.“ *Molecular and cellular neurosciences*.
- Imayoshi, I., T. Ohtsuka, D. Metzger, et al. (2006). „Temporal regulation of Cre recombinase activity in neural stem cells.“ *Genesis* 44(5): 233–238.
- Inoue, T., T. Tanaka, M. Takeichi, et al. (2001). „Role of cadherins in maintaining the compartment boundary between the cortex and striatum during development.“ *Development* 128(4): 561–569.
- Ishii, I., N. Fukushima, X. Ye, et al. (2004). „Lysophospholipid receptors: signaling and biology.“ *Annual review of biochemistry* 73: 321–354.
- Ishikawa, T., M. Kai, I. Wada, et al. (2000). „Cell surface activities of the human type 2b phosphatidic acid phosphatase.“ *The Journal of Biochemistry* 127(4): 645–651.
- Itasaki, N., S. Bel-Vialar und R. Krumlauf (1999). „‘Shocking’ developments in chick embryology: electroporation and in ovo gene expression.“ *Nature cell biology* 1(8): E203–207.
- Jasinska, R., Q. X. Zhang, C. Pilquil, et al. (1999). „Lipid phosphate phosphohydrolase-1 degrades exogenous glycerolipid and sphingolipid phosphate esters.“ *Biochemical Journal* 340 (Pt 3): 677–686.
- Jeong, S. H., S. B. Jun, J. K. Song, et al. (2009). „Activity-dependent neuronal cell migration induced by electrical stimulation.“ *Medical & biological engineering & computing* 47(1): 93–99.
- Jiang, W., W. Gu, T. Brannstrom, et al. (2001). „Cortical neurogenesis in adult rats after transient middle cerebral artery occlusion.“ *Stroke; a journal of cerebral circulation* 32(5): 1201–1207.
- Johansson, M., E. Billstedt, S. Danielsson, et al. (2007). „Autism spectrum disorder and underlying brain mechanism in the oculoauriculovertebral spectrum.“ *Developmental medicine and child neurology* 49(4): 280–288.

- Kaech, S., M. Fischer, T. Doll, et al. (1997). „Isoform specificity in the relationship of actin to dendritic spines.“ *Journal of Neuroscience* 17(24): 9565–9572.
- Kai, M., F. Sakane, Y. J. Jia, et al. (2006). „Lipid phosphate phosphatases 1 and 3 are localized in distinct lipid rafts.“ *The Journal of Biochemistry* 140(5): 677–686.
- Kai, M., I. Wada, S. Imai, et al. (1997). „Cloning and characterization of two human isozymes of Mg²⁺-independent phosphatidic acid phosphatase.“ *The Journal of Biological Chemistry* 272(39): 24572–24578.
- Kanatani, S., H. Tabata und K. Nakajima (2005). „Neuronal migration in cortical development.“ *Journal of child neurology* 20(4): 274–279.
- Kataoka, A. und T. Shimogori (2008). „Fgf8 controls regional identity in the developing thalamus.“ *Development* 135(17): 2873–2881.
- Kawasaki, H., T. Toda und K. Tanno (2013). „In vivo genetic manipulation of cortical progenitors in gyrencephalic carnivores using in utero electroporation.“ *Biology open* 2(1): 95–100.
- Kawauchi, T., K. Chihama, Y. Nabeshima, et al. (2003). „The in vivo roles of STEF/Tiam1, Rac1 and JNK in cortical neuronal migration.“ *The EMBO Journal* 22(16): 4190–4201.
- Kempermann, G. (2002). „Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis.“ *Journal of Neuroscience* 22(3): 635–638.
- Kieselmann, O. (2011). „Influence of lysophosphatidic acid on synaptic transmission and the expression analysis of Plasticity related gene 1 and LPA receptors during brain development.“ *Universitätsbibliothek Freie Universität Berlin DDC 70 Biowissenschaften; Biologie*.
- Kobayashi, K. und K. Nakajima (2008). „Mechanisms of cerebral cortical development.“ *Brain and nerve = Shinkei kenkyu no shinpo* 60(4): 395–403.
- Kwak, S. (2002). „Huntington disease.“ *Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine* 60 Suppl 4: 417–421.
- La Spada, A. R. (2006). „Neurodegeneration: a case of arrested development?“ *Cell* 127(4): 669–671.
- Langevin, L. M., P. Mattar, R. Scardigli, et al. (2007). „Validating in utero electroporation for the rapid analysis of gene regulatory elements in the murine telencephalon.“

- Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists 236(5): 1273–1286.
- Laure-Kamionowska, M. und D. Maslinska (2011). „Cerebellar cortical neurons misplaced in the white matter due to disturbed migration during development of human brain.“ *Folia neuropathologica/Association of Polish Neuropathologists and Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences* 49(4): 282–294.
- Lee, C. W., R. Rivera, A. E. Dubin, et al. (2007). „LPA(4)/GPR23 is a lysophosphatidic acid (LPA) receptor utilizing G(s)-, G(q)/G(i)-mediated calcium signaling and G(12/13)-mediated Rho activation.“ *The Journal of Biological Chemistry* 282(7): 4310–4317.
- Lehmann, S. M., C. Kruger, B. Park, et al. (2012). „An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration.“ *Nature neuroscience* 15(6): 827–835.
- Lein, E. S., M. J. Hawrylycz, N. Ao, et al. (2007). „Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain.“ *Nature* 445(7124): 168–176.
- Letterie, G. S., M. L. Hibbert und B. A. Britton (1993). „Endometrial histology after electrocoagulation using different power settings.“ *Fertility and sterility* 60(4): 647–651.
- Liu, X. F. und K. Haas (2011). „Single-cell electroporation in *Xenopus*.“ *Cold Spring Harbor protocols* 2011(9).
- Lois, C., J. M. Garcia-Verdugo und A. Alvarez-Buylla (1996). „Chain migration of neuronal precursors.“ *Science* 271(5251): 978–981.
- Loonstra, A., M. Vooijs, H. B. Beverloo, et al. (2001). „Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(16): 9209–9214.
- Lopez-Garcia, C., A. Molowny, F. J. Martinez-Guijarro, et al. (1992). „Lesion and regeneration in the medial cerebral cortex of lizards.“ *Histology and Histopathology* 7(4): 725–746.
- LoTurco, J., J. B. Manent und F. Sidiqi (2009). „New and improved tools for in utero electroporation studies of developing cerebral cortex.“ *Cerebral cortex* 19 Suppl 1: i120–125.
- Lu, Y., H. Inokuchi, E. M. McLachlan, et al. (2001). „Correlation between electrophysiology and morphology of three groups of neuron in the dorsal commissural nucleus of

- lumbar spinal cord of mature rats studied in vitro." *The Journal of comparative neurology* 437(2): 156–169.
- Luo, L. (2002). „Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity.“ *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 18: 601–635.
- Luskin, M. B. (1993). „Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone.“ *Neuron* 11(1): 173–189.
- Magda, II, I. N. Gladenko, Voronin, II, et al. (1971). „Use of Rompun in veterinary surgery.“ *Veterinariia* 4: 76–80.
- Malatesta, P., M. A. Hack, E. Hartfuss, et al. (2003). „Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate.“ *Neuron* 37(5): 751–764.
- Mandala, S. M., R. Thornton, I. Galve-Roperh, et al. (2000). „Molecular cloning and characterization of a lipid phosphohydrolase that degrades sphingosine-1-phosphate and induces cell death.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(14): 7859–7864.
- Manzini, M. C., A. Rajab, T. M. Maynard, et al. (2010). „Developmental and degenerative features in a complicated spastic paraplegia.“ *Annals of neurology* 67(4): 516–525.
- Marin, O. und J. L. Rubenstein (2001). „A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon.“ *Nature Reviews Neuroscience* 2(11): 780–790.
- Marin, O., A. Yaron, A. Bagri, et al. (2001). „Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions.“ *Science* 293(5531): 872–875.
- Martin, G. T., U. F. Pliquet und J. C. Weaver (2002). „Theoretical analysis of localized heating in human skin subjected to high Voltage pulses.“ *Bioelectrochemistry* 57(1): 55–64.
- Matsuda, T. und C. L. Cepko (2004). „Electroporation and RNA interference in the rodent retina in vivo and in vitro.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(1): 16–22.
- Matsuda, T. und C. L. Cepko (2007). „Controlled expression of transgenes introduced by in vivo electroporation.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(3): 1027–1032.

- Matsui, A., A. C. Yoshida, M. Kubota, et al. (2011). „Mouse in utero electroporation: controlled spatiotemporal gene transfection.“ *Journal of visualized experiments* (54). pii: 3024
- McDermott, M. I., Y. J. Sigal, V. A. Sciorra, et al. (2004). „Is PRG-1 a new lipid phosphatase?“ *Nature Neuroscience* 7(8): 789; author reply 789–790.
- McGiffert, C., J. J. Contos, B. Friedman, et al. (2002). „Embryonic brain expression analysis of lysophospholipid receptor genes suggests roles for s1p(1) in neurogenesis and s1p(1–3) in angiogenesis.“ *FEBS letters* 531(1): 103–108.
- McKay, R. (1997). „Stem cells in the central nervous system.“ *Science* 276(5309): 66–71.
- McMillan, K. M., M. Ehtesham, C. B. Stevenson, et al. (2009). „T2 detection of tumor invasion within segmented components of glioblastoma multiforme.“ *Journal of magnetic resonance imaging: JMRI* 29(2): 251–257.
- Mills, G. B. und W. H. Moolenaar (2003). „The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer.“ *Nature reviews. Cancer* 3(8): 582–591.
- Minati, L., S. Piacentini, F. Ferre, et al. (2011). „Choice-option evaluation is preserved in early Huntington and Parkinson’s disease.“ *Neuroreport* 22(15): 753–757.
- Minogue, S. C. und D. A. Sun (2005). „Bacteriostatic saline containing benzyl alcohol decreases the pain associated with the injection of propofol.“ *Anesthesia and analgesia* 100(3): 683–686.
- Mochida, G. H. (2009). „Genetics and biology of microcephaly and lissencephaly.“ *Seminars in pediatric neurology* 16(3): 120–126.
- Momose, T., A. Tonegawa, J. Takeuchi, et al. (1999). „Efficient targeting of gene expression in chick embryos by microelectroporation.“ *Development Growth & Differentiation* 41(3): 335–344.
- Morton, D. B. (2000). „A systematic approach for establishing humane endpoints.“ *ILAR journal/National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* 41(2): 80–86.
- Muramatsu, T. (2000). „In ovo gene electroporation into early chicken embryos.“ *Methods in molecular medicine* 37: 369–376.

- Muramatsu, T., Y. Mizutani, Y. Ohmori, et al. (1997). „Comparison of three nonviral transfection methods for foreign gene expression in early chicken embryos in ovo.“ *Biochemical and biophysical research communications* 230(2): 376–380.
- Murase, S. und A. F. Horwitz (2002). „Deleted in colorectal carcinoma and differentially expressed integrins mediate the directional migration of neural precursors in the rostral migratory stream.“ *Journal of Neuroscience* 22(9): 3568–3579.
- Nadarajah, B., J. E. Brunstrom, J. Grutzendler, et al. (2001). „Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex.“ *Nature neuroscience* 4(2): 143–150.
- Nadarajah, B. und J. G. Parnavelas (2002). „Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex.“ *Nature Reviews Neuroscience* 3(6): 423–432.
- Nakahira, E. und S. Yuasa (2005). „Neuronal generation, migration, and differentiation in the mouse hippocampal primordium as revealed by enhanced green fluorescent protein gene transfer by means of in utero electroporation.“ *The Journal of comparative neurology* 483(3): 329–340.
- Nanjundan, M. und F. Possmayer (2001). „Molecular cloning and expression of pulmonary lipid phosphate phosphohydrolases.“ *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 281(6): L1484–1493.
- Navarro-Quiroga, I., R. Chittajallu, V. Gallo, et al. (2007). „Long-term, selective gene expression in developing and adult hippocampal pyramidal neurons using focal in utero electroporation.“ *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 27(19): 5007–5011.
- Neumann, E., M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, et al. (1982). „Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields.“ *The EMBO journal* 1(7): 841–845.
- Nishimura, Y. V., T. Shinoda, Y. Inaguma, et al. (2012). „Application of in utero electroporation and live imaging in the analyses of neuronal migration during mouse brain development.“ *Medical molecular morphology* 45(1): 1–6.
- Nishiyama, J., Y. Hayashi, T. Nomura, et al. (2012). „Selective and regulated gene expression in murine Purkinje cells by in utero electroporation.“ *The European journal of neuroscience* 36(7): 2867–2876.

- Nunes, M. C., N. S. Roy, H. M. Keyoung, et al. (2003). „Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain.“ *Nature Medicine* 9(4): 439–447.
- Nurnberg, A., A. U. Bräuer, N. Wettschureck, et al. (2008). „Antagonistic regulation of neurite morphology through Gq/G11 and G12/G13.“ *The Journal of Biological Chemistry* 283(51): 35526–35531.
- O’Donovan, M. C., N. Craddock und M. J. Owen (2008). „Schizophrenia: complex genetics, not fairy tales.“ *Psychological medicine* 38(12): 1697–1699; discussion 1818–1620.
- O’Donovan, M. C., N. J. Craddock und M. J. Owen (2009). „Genetics of psychosis; insights from views across the genome.“ *Human genetics* 126(1): 3–12.
- O’Rourke, N. A., D. P. Sullivan, C. E. Kaznowski, et al. (1995). „Tangential migration of neurons in the developing cerebral cortex.“ *Development* 121(7): 2165–2176.
- Ohshima, T., M. Hirasawa, H. Tabata, et al. (2007). „Cdk5 is required for multipolar-to-bipolar transition during radial neuronal migration and proper dendrite development of pyramidal neurons in the cerebral cortex.“ *Development* 134(12): 2273–2282.
- Okada, T., K. Keino-Masu und M. Masu (2007). „Migration and nucleogenesis of mouse precerebellar neurons visualized by in utero electroporation of a green fluorescent protein gene.“ *Neuroscience research* 57(1): 40–49.
- Pacary, E., M. A. Haas, H. Wildner, et al. (2012). „Visualization and genetic manipulation of dendrites and spines in the mouse cerebral cortex and hippocampus using in utero electroporation.“ *Journal of visualized experiments* (65).
- Pan, C. J., K. J. Lei, B. Annabi, et al. (1998). „Transmembrane topology of glucose-6-phosphatase.“ *The Journal of Biological Chemistry* 273(11): 6144–6148.
- Park, H. T., J. Wu und Y. Rao (2002). „Molecular control of neuronal migration.“ *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 24(9): 821–827.
- Paszkowski, J., R. D. Shillito, M. Saul, et al. (1984). „Direct gene transfer to plants.“ *The EMBO journal* 3(12): 2717–2722.
- Pearlman, A. L. und A. M. Sheppard (1996). „Extracellular matrix in early cortical development.“ *Progress in Brain Research* 108: 117–134.

- Peeva, G. P., S. K. Angelova, O. Guntinas-Lichius, et al. (2006). „Improved outcome of facial nerve repair in rats is associated with enhanced regenerative response of motor-neurons and augmented neocortical plasticity.“ *European Journal of Neuroscience* 24 (8): 2152–2162.
- Pfeifer, A., E. P. Brandon, N. Kootstra, et al. (2001). „Delivery of the Cre recombinase by a self-deleting lentiviral vector: efficient gene targeting in vivo.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(20): 11450–11455.
- Piliszek, A., G. S. Kwon und A. K. Hadjantonakis (2011). „Ex utero culture and live imaging of mouse embryos.“ *Methods in molecular biology* 770: 243–257.
- Potter, H. (1988). „Electroporation in biology: methods, applications, and instrumentation.“ *Analytical biochemistry* 174(2): 361–373.
- Powell, E. M., W. M. Mars und P. Levitt (2001). „Hepatocyte growth factor/scatter factor is a motogen for interneurons migrating from the ventral to dorsal telencephalon.“ *Neuron* 30(1): 79–89.
- Prozorovski, T., U. Schulze-Topphoff, R. Glumm, et al. (2008). „Sirt1 contributes critically to the redox-dependent fate of neural progenitors.“ *Nature cell biology* 10(4): 385–394.
- Pu, H. F. und A. P. Young (1990). „Glucocorticoid-inducible expression of a glutamine synthetase-CAT-encoding fusion plasmid after transfection of intact chicken retinal explant cultures.“ *Gene* 89(2): 259–263.
- Punzo, C. und C. L. Cepko (2008). „Ultrasound-guided in utero injections allow studies of the development and function of the eye.“ *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 237(4): 1034–1042.
- Rakic, P. (1995). „Radial versus tangential migration of neuronal clones in the developing cerebral cortex.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(25): 11323–11327.
- Rambabu, K. M., S. H. Rao und N. M. Rao (2005). „Efficient expression of transgenes in adult zebrafish by electroporation.“ *BMC biotechnology* 5: 29.
- Ribas, G. C. (2010). „The cerebral sulci and gyri.“ *Neurosurgical focus* 28(2): E2.
- Rice, H., S. Suth, W. Cavanaugh, et al. (2010). „In utero electroporation followed by primary neuronal culture for studying gene function in subset of cortical neurons.“ *Journal of visualized experiments* (44). pii: 2103

- Roberts, R., V. A. Sciorra und A. J. Morris (1998). „Human type 2 phosphatidic acid phosphohydrolases. Substrate specificity of the type 2a, 2b, and 2c enzymes and cell surface activity of the 2a isoform.“ *Journal of Biological Chemistry* 273(34): 22059–22067.
- Roberts, R. Z. und A. J. Morris (2000). „Role of phosphatidic acid phosphatase 2a in uptake of extracellular lipid phosphate mediators.“ *Biochimica et Biophysica Acta* 1487(1): 33–49.
- Roorda, B. D., M. K. Hesselink, G. Schaart, et al. (2005). „DGAT1 overexpression in muscle by in vivo DNA electroporation increases intramyocellular lipid content.“ *Journal of lipid research* 46(2): 230–236.
- Rossant, J. und P. P. L. Tam (2002). "Mouse Development: Patterning, Morphogenesis, and Organogenesis". Academic Press. ISBN: 978-0-12-597951-1
- Rugarli, E. I. und A. Ballabio (1995). „Reelin: a novel extracellular matrix protein involved in brain lamination.“ *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 17(10): 832–834.
- Rumberger, A., M. Schmidt, H. Lohmann, et al. (1998). „Correlation of electrophysiology, morphology, and functions in corticotectal and corticopretectal projection neurons in rat visual cortex.“ *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale* 119(3): 375–390.
- Russell, V. A., R. D. Oades, R. Tannock, et al. (2006). „Response variability in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: a neuronal and glial energetics hypothesis.“ *Behavioral and brain functions: BBF* 2: 30.
- Russell, W. M. (1995). „The development of the three Rs concept.“ *Alternatives to laboratory animals: ATLA* 23(3): 298–304.
- Sabiston, B. H., J. E. Rose und B. Cinader (1978). „Temperature stress and immunity in mice: effects of environmental temperature on the antibody response to human immunoglobulin of mice, differing in age and strain.“ *Journal of immunogenetics* 5(3): 197–212.
- Saito, T. (2006). „In vivo electroporation in the embryonic mouse central nervous system.“ *Nature protocols* 1(3): 1552–1558.

- Saito, T. und N. Nakatsuji (2001). „Efficient gene transfer into the embryonic mouse brain using in vivo electroporation.“ *Developmental biology* 240(1): 237–246.
- Sakai, Y. (1987). „Neurulation in the mouse. I. The ontogenesis of neural segments and the determination of topographical regions in a central nervous system.“ *The Anatomical Record* 218(4): 450–457.
- Sauer, M. E. und B. E. Walker (1959). „Radioautographic study of interkinetic nuclear migration in the neural tube.“ *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 101(3): 557–560.
- Sauerzweig, S., K. Baldauf, H. Braun, et al. (2009). „Time-dependent segmentation of BrdU-signal leads to late detection problems in studies using BrdU as cell label or proliferation marker.“ *Journal of neuroscience methods* 177(1): 149–159.
- Sawada, K. und M. Watanabe (2012). „Development of cerebral sulci and gyri in ferrets (*Mustela putorius*).“ *Congenital anomalies* 52(3): 168–175.
- Scannevin, R. H. und R. L. Huganir (2000). „Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses.“ *Nature Reviews Neuroscience* 1(2): 133–141.
- Schambra, U. B., J. Silver und J. M. Lauder (1991). „An atlas of the prenatal mouse brain: gestational day 14.“ *Experimental neurology* 114(2): 145–183. Erratum (1992). 115(3) 429-35
- Schambra (2008). "Prenatal Mouse Brain Atlas." Springer-Verlag. ISBN 978-0-387-47093-1
- Schlüter, L. (2011). „The role of PRG-1 during axonal outgrowth and spine formation.“ *Universitätsbibliothek Freie Universität Berlin DDC 572 Biochemistry*.
- Sciorra, V. A. und A. J. Morris (1999). „Sequential actions of phospholipase D and phosphatidic acid phosphohydrolase 2b generate diglyceride in mammalian cells.“ *Molecular Biology of the Cell* 10(11): 3863–3876.
- Sciorra, V. A. und A. J. Morris (2002). „Roles for lipid phosphate phosphatases in regulation of cellular signaling.“ *Biochimica et biophysica acta* 1582(1–3): 45–51.
- Seymour, R. M. und M. Berry (1975). „Scanning and transmission electron microscope studies of interkinetic nuclear migration in the cerebral vesicles of the rat.“ *Journal of Comparative Neurology* 160(1): 105–125.

- Shim, J. H., S. A. Cho, M. J. Seo, et al. (2010). „Proteomic analysis of time-dependent difference of protein expression profile changes during neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells.“ *Molecules and cells* 29(3): 239–244.
- Shimogori, T. (2006). „Micro in utero electroporation for efficient gene targeting in mouse embryos.“ *Cold Spring Harbor Protocols* 2006(1).
- Shimogori, T. und M. Ogawa (2008). „Gene application with in utero electroporation in mouse embryonic brain.“ *Development, growth & differentiation* 50(6): 499–506.
- Sigal, Y. J., M. I. McDermott und A. J. Morris (2005). „Integral membrane lipid phosphatases/ phosphotransferases: common structure and diverse functions.“ *The Biochemical journal* 387(Pt 2): 281–293.
- Sigal, Y. J., O. A. Quintero, R. E. Cheney, et al. (2007). „Cdc42 and ARP2/3-independent regulation of filopodia by an integral membrane lipid-phosphatase-related protein.“ *Journal of Cell Science* 120(Pt 2): 340–352.
- Sirko, S., A. Neitz, T. Mittmann, et al. (2009). „Focal laser-lesions activate an endogenous population of neural stem/progenitor cells in the adult visual cortex.“ *Brain* 132(Pt 8): 2252–2264.
- Skarda, R., R. Beglinger und A. Müller (1970). „The behavior of blood circulation and respiration in the drug-recumbent horse using Rompun and Pentothal.“ *Schweizer Archiv für Tierheilkunde Gesellschaft Schweizerischer Tierärzte* 112(9): 458–463.
- Skutella, T. und R. Nitsch (2001). „New molecules for hippocampal development.“ *Trends Neuroscience* 24(2): 107–113.
- Smyth, S. S., V. A. Sciorra, Y. J. Sigal, et al. (2003). „Lipid phosphate phosphatases regulate lysophosphatidic acid production and signaling in platelets: studies using chemical inhibitors of lipid phosphate phosphatase activity.“ *The Journal of Biological Chemistry* 278(44): 43214–43223.
- Soliven, B., V. Miron und J. Chun (2011). „The neurobiology of sphingosine 1-phosphate signaling and sphingosine 1-phosphate receptor modulators.“ *Neurology* 76(8 Suppl 3): S9–14.
- Soma, M., H. Aizawa, Y. Ito, et al. (2009). „Development of the mouse amygdala as revealed by enhanced green fluorescent protein gene transfer by means of in utero electroporation.“ *The Journal of comparative neurology* 513(1): 113–128.

- Sperry, R. W. (1959). „The growth of nerve circuits.“ *Scientific American* 201: 68–75.
- Spitzer, N. C. (2006). „Electrical activity in early neuronal development.“ *Nature* 444(7120): 707–712.
- Stein, E., N. E. Savaskan, O. Ninnemann, et al. (1999). „A role for the Eph ligand ephrin-A3 in entorhino-hippocampal axon targeting.“ *Journal of Neuroscience* 19(20): 8885–8893. Erratum (2012) *Mai* 16;32(20):7102.
- Stephan, H. (1975). „Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Allocortex.“ Springer-Verlag Bd. 9: 1–998.
- Stephan, H. (1976). „Comparative anatomy of allocortex.“ *Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft*(70 Pt 1): 217–251.
- Stukey, J. und G. M. Carman (1997). „Identification of a novel phosphatase sequence motif.“ *Protein Science* 6(2): 469–472.
- Swartz, M., J. Eberhart, G. S. Mastick, et al. (2001). „Sparking new frontiers: using in vivo electroporation for genetic manipulations.“ *Developmental biology* 233(1): 13–21.
- Swayze, V. W., N. C. Andreasen, J. C. Ehrhardt, et al. (1990). „Developmental abnormalities of the corpus callosum in schizophrenia.“ *Archives of neurology* 47(7): 805–808.
- Tabata, H. und K. Nakajima (2001). „Efficient in utero gene transfer system to the developing mouse brain using electroporation: visualization of neuronal migration in the developing cortex.“ *Neuroscience* 103(4): 865–872.
- Tabata, H. und K. Nakajima (2003). „Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex.“ *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 23(31): 9996–10001.
- Tabata, H. und K. Nakajima (2008). „Labeling embryonic mouse central nervous system cells by in utero electroporation.“ *Development, growth & differentiation* 50(6): 507–511.
- Takahashi, M., K. Sato, T. Nomura, et al. (2002). „Manipulating gene expressions by electroporation in the developing brain of mammalian embryos.“ *Differentiation; research in biological diversity* 70(4–5): 155–162.
- Takahashi, T., R. S. Nowakowski und V. S. Caviness, Jr. (1995). „The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall.“ *The*

- Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience 15(9): 6046–6057.
- Takahashi, T., R. S. Nowakowski und V. S. Caviness, Jr. (1996). „The leaving or Q fraction of the murine cerebral proliferative epithelium: a general model of neocortical neurogenesis.“ *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 16(19): 6183–6196.
- Taniguchi, Y., T. Young-Pearse, A. Sawa, et al. (2012). „In utero electroporation as a tool for genetic manipulation in vivo to study psychiatric disorders: from genes to circuits and behaviors.“ *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 18(2): 169–179.
- Temple, S. (2001). „The development of neural stem cells.“ *Nature* 414(6859): 112–117.
- Theiler, K. (1989). "The House Mouse - Atlas of Embryonic Development". Springer-Verlag. Heidelberg, Bozeman, Montana: ISBN 978-3-642-88418-4.
- Tomsig, J. L., A. H. Snyder, E. V. Berdyshev, et al. (2009). „Lipid phosphate phosphohydrolase type 1 (LPP1) degrades extracellular lysophosphatidic acid in vivo.“ *The Biochemical journal* 419(3): 611–618.
- Torii, M. und P. Levitt (2005). „Dissociation of corticothalamic and thalamocortical axon targeting by an EphA7-mediated mechanism.“ *Neuron* 48(4): 563–575.
- Trepel, M. (2008). „Neuroanatomy.“ Elsevier Urban & Fischer 4. Auflage: I-XIII, 1–450. ISBN: 343741299X
- Trimbuch, T. (2009). „Investigation of the physiological role of PRG-1 by generating and phenotyping of PRG-1 deficient mouse models.“ *Universitätsbibliothek Freie Universität Berlin DDC 570 Biology: X*, 110 S.
- Trimbuch, T., P. Beed, J. Vogt, et al. (2009). „Synaptic PRG-1 modulates excitatory transmission via lipid phosphate-mediated signaling.“ *Cell* 138(6): 1222–1235, Erratum (2011) September 16; 146(6):1043.
- Tsuchiya, D., S. Hong, S. W. Suh, et al. (2002). „Mild hypothermia reduces zinc translocation, neuronal cell death, and mortality after transient global ischemia in mice.“ *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 22(10): 1231–1238.

- Tsuchiya, R., K. Takahashi, F. C. Liu, et al. (2009). „Aberrant axonal projections from mammillary bodies in Pax6 mutant mice: possible roles of Netrin-1 and Slit 2 in mammillary projections.“ *Journal of neuroscience research* 87(7): 1620–1633.
- Tupin, E., B. Poirier, M. F. Bureau, et al. (2003). „Non-viral gene transfer of murine spleen cells achieved by in vivo electroporation.“ *Gene therapy* 10(7): 569–579.
- van Pelt, J., A. E. Dityatev und H. B. Uylings (1997). „Natural variability in the number of dendritic segments: model-based inferences about branching during neurite outgrowth.“ *The Journal of comparative neurology* 387(3): 325–340.
- Velmans, T. (2010). „Function and expression of plasticity related gene 3 and lipid phosphate phosphatase 1 and 1a during brain development.“ *Universitätsbibliothek Freie Universität Berlin DDC 570 Biowissenschaften: X*, 132 S.
- Viktorov, I. V. und L. G. Khaspekov (1976). „Formation of cellular structures and interneuronal connections in an organotypic culture of newborn mouse hippocampal tissue.“ *Neirofiziologija = Neurophysiology* 8(4): 384–390.
- Walsh, C. A. und A. M. Goffinet (2000). „Potenzial mechanisms of mutations that affect neuronal migration in man and mouse.“ *Current Opinion in Genetics & Development* 10(3): 270–274.
- Wang, L., H. Jiang und J. V. Brigande (2012). „Gene transfer to the developing mouse inner ear by in vivo electroporation.“ *Journal of visualized experiments* (64).
- Wang, Y., B. Wan, D. Li, et al. (2012). „BRSK2 is regulated by ER stress in protein level and involved in ER stress-induced apoptosis.“ *Biochemical and biophysical research communications* 423(4): 813–818. Erratum (2012) Oktober 5;426(4):667.
- Weissman, T., S. C. Noctor, B. K. Clinton, et al. (2003). „Neurogenic radial glial cells in reptile, rodent and human: from mitosis to migration.“ *Cerebral cortex* 13(6): 550–559.
- Wernig, M. und O. Brustle (2002). „Fifty ways to make a neuron: shifts in stem cell hierarchy and their implications for neuropathology and CNS repair.“ *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 61(2): 101–110.
- Wu, W., K. Wong, J. Chen, et al. (1999). „Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit.“ *Nature* 400(6742): 331–336.
- Wynshaw-Boris, A. und M. J. Gambello (2001). „LIS1 and dynein motor function in neuronal migration and development.“ *Genes Development* 15(6): 639–651.

- Xiang, L., A. Murai und T. Muramatsu (2004). „The effects of agouti-related protein gene transfer in vivo by electroporation in mice.“ *Neuroscience letters* 370(2–3): 108–113.
- Yoshida, A., Y. Yamaguchi, K. Nonomura, et al. (2010). „Simultaneous expression of different transgenes in neurons and glia by combining in utero electroporation with the Tol2 transposon-mediated gene transfer system.“ *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms* 15(5): 501–512.
- Yuan, W., L. Zhou, J. H. Chen, et al. (1999). „The mouse SLIT family: secreted ligands for ROBO expressed in patterns that suggest a role in morphogenesis and axon guidance.“ *Developmental Biology* 212(2): 290–306.
- Yue, J., K. Yokoyama, L. Balazs, et al. (2004). „Mice with transgenic overexpression of lipid phosphate phosphatase-1 display multiple organotypic deficits without alteration in circulating lysophosphatidate level.“ *Cell Signal* 16(3): 385–399.
- Yue, J., K. Yokoyama, L. Balazs, et al. (2004). „Mice with transgenic overexpression of lipid phosphate phosphatase-1 display multiple organotypic deficits without alteration in circulating lysophosphatidate level.“ *Cellular signalling* 16(3): 385–399.
- Zhang, N., J. P. Sundberg und T. Gridley (2000). „Mice mutant for Ppap2c, a homolog of the germ cell migration regulator wunen, are viable and fertile.“ *Genesis* 27(4): 137–140.
- Zhang, Q. X., C. S. Pilquill, J. Dewald, et al. (2000). „Identification of structurally important domains of lipid phosphate phosphatase-1: implications for its sites of action.“ *The Biochemical journal* 345 Pt 2: 181–184.
- Zhang, Y., B. Niu, D. Yu, et al. (2010). „Radial glial cells and the lamination of the cerebellar cortex.“ *Brain structure & function* 215(2): 115–122.
- Zhao, H., T. Maruyama, Y. Hattori, et al. (2011). „A molecular mechanism that regulates medially oriented axonal growth of upper layer neurons in the developing neocortex.“ *The Journal of comparative neurology* 519(5): 834–848.
- Zhao, H., J. Oczos, P. Janowski, et al. (2010). „Rationale for the real-time and dynamic cell death assays using propidium iodide.“ *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology* 77(4): 399–405.
- Zheng, W. und X. Yuan (2008). „Guidance of cortical radial migration by gradient of diffusible factors.“ *Cell adhesion & migration* 2(1): 48–50.

Zhvaniia, M. G., N. D. Dzhaparidze und T. A. Bolkvadze (2005). „Characteristics of structural organization of interneurons in CA 3 region and mossy fibers of hippocampus.“ *Morfologiia* 127(1): 78–83.

Zurita, E., M. Chagoyen, M. Cantero, et al. (2011). „Genetic polymorphisms among C57BL/6 mouse inbred strains.“ *Transgenic research* 20(3): 481–489.

Anhang:

Anhang 1A: Kopierrechte Kawauchi et al. 2003

Rightslink Printable License	https://s100.copyright.com/App/PrintableLicenseFrame.jsp?p...
JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS	
Aug 11, 2014	
<hr/> <p>This is a License Agreement between Jan Baumgat ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by John Wiley and Sons, and the payment terms and conditions.</p> <p>All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.</p>	
License Number	3445860950837
License date	Aug 11, 2014
Licensed content publisher	John Wiley and Sons
Licensed content publication	The EMBO Journal
Licensed content title	The in vivo roles of STEF/Tiam1, Rac1 and JNK in cortical neuronal migration
Licensed copyright line	Copyright © 2003 European Molecular Biology Organization
Licensed content author	Takeshi Kawauchi, Kaori Chihama, Yo-ichi Nabeshima, Mikio Hoshino
Licensed content date	Aug 15, 2003
Start page	4190
End page	4201
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Original Wiley figure/table number(s)	Figure 1 A
Will you be translating?	No
Title of your thesis / dissertation	"Etablierung der in utero Elektroporation des zentralen Nervensystems im Mausmodell C57BL/6"
Expected completion date	Oct 2014
Expected size (number of pages)	150
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	
TERMS AND CONDITIONS	
1 von 7	11.08.14 12:23

Anhang 1B: Kopierrechte Itasaki et al. 1999

Rightslink Printable License

<https://s100.copyright.com/App/PrintableLicenseFrame.jsp?p...>

**NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Aug 09, 2014

This is a License Agreement between Jan Baumgat ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3444891277762
License date	Aug 09, 2014
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Nature Cell Biology
Licensed content title	/' Shocking/' developments in chick embryology: electroporation and : in ovo: gene expression
Licensed content author	Nobue Itasaki, Sophie Bel-Vialar and Robb Krumlauf
Licensed content date	Dec 1, 1999
Volume number	1
Issue number	8
Type of Use	reuse in a dissertation / thesis
Requestor type	non-commercial (non-profit)
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables /illustrations	1
Figures	Figure 4c
Author of this NPG article	no
Your reference number	None
Title of your thesis / dissertation	"Etablierung der in utero Elektroporation des zentralen Nervensystems im Mausmodell C57BL/6"
Expected completion date	Oct 2014
Estimated size (number of pages)	150
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

Terms and Conditions for Permissions

1 von 3

09.08.14 19:44

Anhang 1C: Kopierrechte Gupta et al. 2002

Rightslink Printable License

<https://s100.copyright.com/App/PrintableLicenseFrame.jsp?p...>

**NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Aug 09, 2014

This is a License Agreement between Jan Baumgat ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3444900252669
License date	Aug 09, 2014
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Nature Reviews Genetics
Licensed content title	Life is a journey: a genetic look at neocortical development
Licensed content author	Amitabh Gupta, Li-Huei Tsai and Anthony Wynshaw-Boris
Licensed content date	May 1, 2002
Volume number	3
Issue number	5
Type of Use	reuse in a dissertation / thesis
Requestor type	non-commercial (non-profit)
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables /illustrations	1
High-res required	no
Figures	figure 1b
Author of this NPG article	no
Your reference number	None
Title of your thesis / dissertation	"Etablierung der in utero Elektroporation des zentralen Nervensystems im Mausmodell C57BL/6"
Expected completion date	Oct 2014
Estimated size (number of pages)	150
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

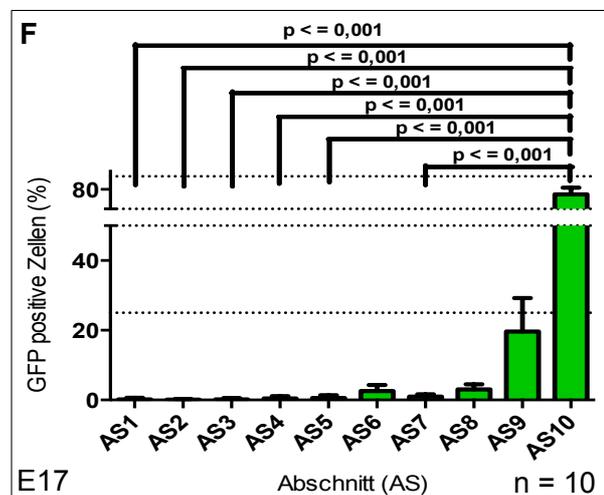
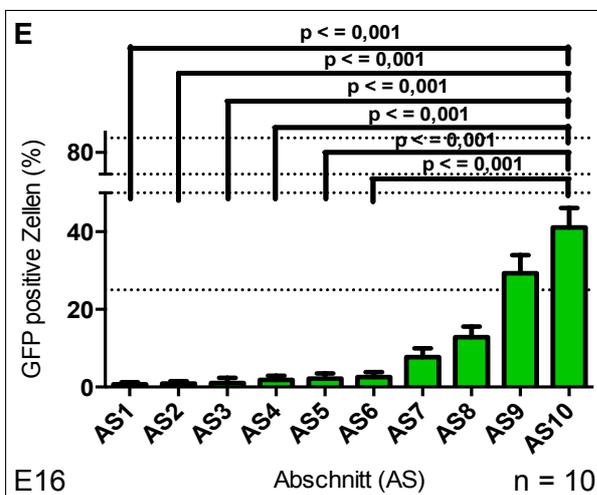
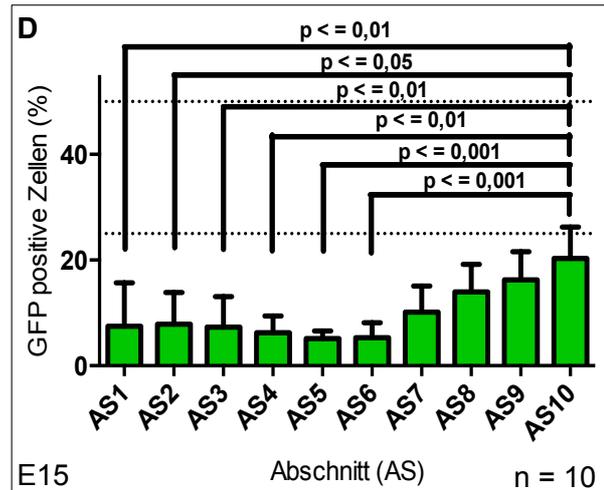
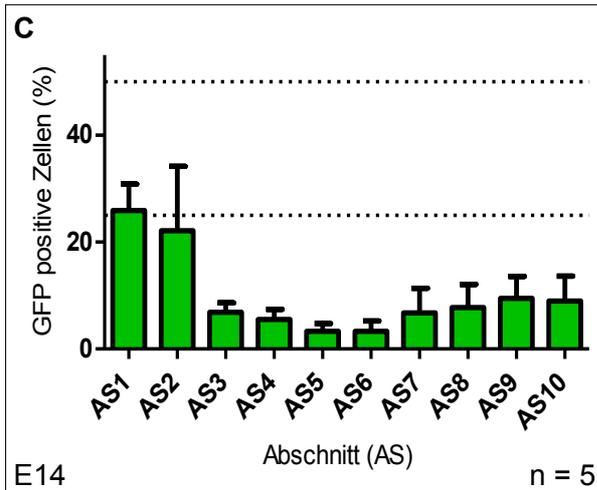
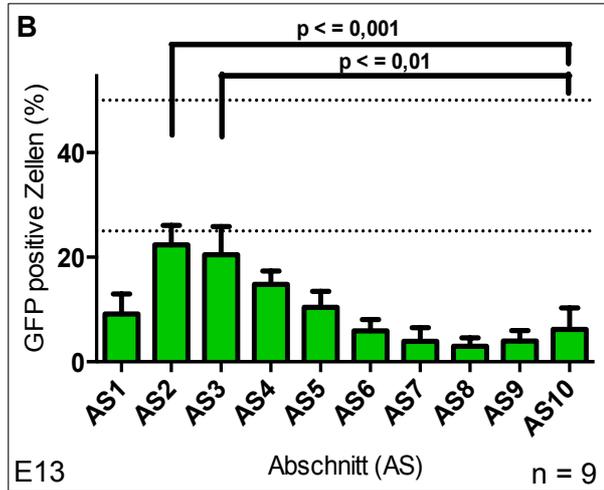
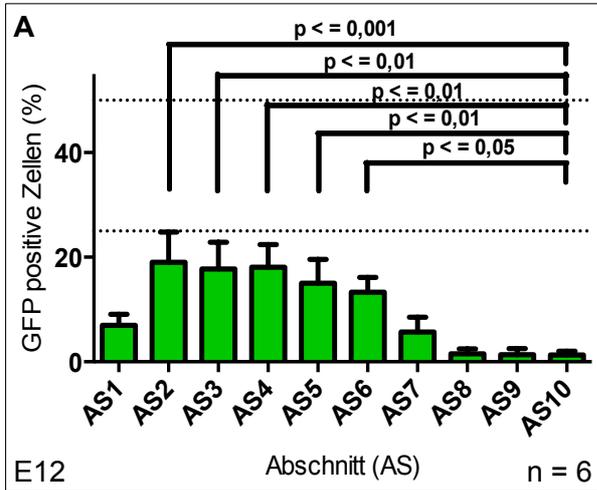
Terms and Conditions for Permissions

1 von 3

09.08.14 19:52

Anhang 2: Quantitative Auszählung transfizierter GFP-positiver Zellen in Abhängigkeit vom manipulierten Embryonalstadium

(A-F: AS = Abschnitt, Kruskal-Wallis-Test, Post-hoc-Test Dunns-Korrektur, Mittelwert mit SD, alle nicht dargestellten Vergleiche zwischen AS10 und AS1-AS9 waren nicht signifikant ($p > 0,05$), Anzahl transfizierter Embryonen bei Transfektion im Embryonalalter E12 $n = 6$, E13 $n = 9$, E14 $n = 5$, E15 $n = 10$, E16 $n = 10$ und E17 $n = 10$, $p =$ Signifikanzwert).



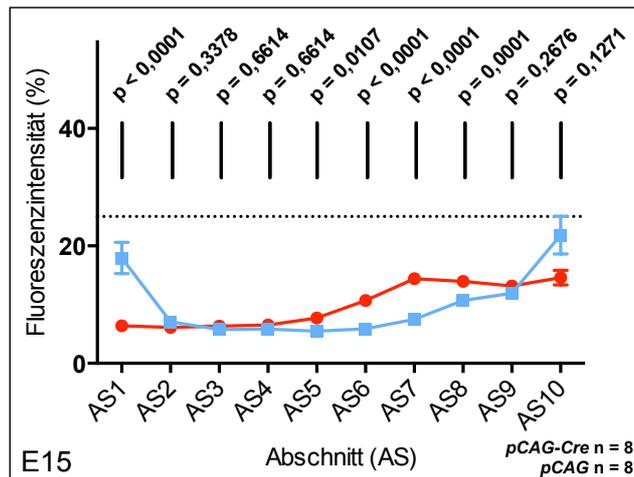
Anhang 3: Selbst erstelltes postoperatives Belastungsprotokoll für wichtige Parameter des Erscheinungsbildes und Verhaltens der Tiere nach IUE

Mithilfe dieser Quantifizierung konnten Rückschlüsse eines negativen Effektes auf den Transfektionserfolg bei länger andauernden Operationszeiten untersucht werden (für die Vorlage der einzelnen Symptome zur Belastungseinschätzung wurde die „Orientierungshilfe zur Einstufung in Belastungsgrade für genehmigungspflichtige Tierversuche“ (Stand 21. 09. 2010, Charité Berlin, Deutschland) genutzt).

Belastungsprotokoll (Muttertier): G ...		„In-utero-Elektroporation“	
Tier Nummer: laufende Nummer/Monat/Jahr		Datum der OP:	
Tier hat sich 4 - 6 Stunden nach der OP (Tag 0) normal verhalten (Nahrungs- und Wasseraufnahme, Körperhaltung, arttypisches Verhalten, ...):			
		JA <input type="checkbox"/> NEIN <input type="checkbox"/>	
Wenn NEIN welche Auffälligkeiten:			
Symptome	Anweisung	Tag 1 <small>Name (Grad 0-2)</small>	Tag 2 <small>Name (Grad 0-2)</small>
Tier isoliert sich	A		
struppiges Fell	A		
aufgetriebener Leib	A		
verstärkte Atmung	B		
Durchfall	B		
Keuchen	B		
Krämpfe, Torkeln, Apathie	B		
Schmerz (Gesichtsausdruck; Haltung gekrümmt oder Leib aufgezogen; Laufen auf Zehenspitzen)	B		
Blässe (Augen, Ohren, Haut)	B		
Blut an Körperöffnungen	B		
dunkle Verfärbung des Unterbauchs	C		
Verletzungen, Hautveränderungen	A		
Fehlstellung der Zähne	A		
Tier vermeidet Bewegungen	A		
Teilnahmslosigkeit	A		
Schmerzen beim Anfassen	A/B		
Bauch hart oder gespannt	A/B		
Schwellungen, Neubildungen (Art, Größe)	A/B		
Hautfalten bleiben stehen	B		
ungewöhnliche Zunahme	A		
akute Abnahme des KGW von mehr als: 10%	A/B		
	B/C		
Grad 0 - 2: Stufe 0: Keine Auffälligkeiten, Stufe 1: schwache Auffälligkeiten, Stufe 2: deutliche Auffälligkeiten			
Weitere Bemerkungen:			
Anweisungen:			
A - Bei nur einem Symptom: das Tier weiter beobachten; bei Kombinationen mit anderen Symptomen: das Tier dem Tierarzt oder dem Projektleiter bzw. dem stellvertretendem Projektleiter vorstellen.			
B - Diese Tiere dem Tierarzt vorführen. Bei Kombination mehrerer Symptome werden die Tiere getötet.			
C - Die Tiere werden sofort getötet.			

Anhang 4: Transfektion mit einer Cre-Rekombinase im intakten Nervengewebe einer C57BL/6-Maus

Der Vergleich der Transfektion eines Plasmids mit einer Cre-Rekombinase (*pCAG-Cre* in PRG-1-wt) mit Kontrollen (*pCAG* in PRG-1-wt) zeigte eine höhere Verteilung transfizierter Zellen in den Abschnitten zwischen der subventrikulären Zone bis zu den unteren Schichten der kortikalen Platte (AS5-AS8). Im Abschnitt der oberen kortikalen Platte und Marginalzone kam es zu signifikant höheren Fluoreszenzsignalen in den Kontrollen (blau: Kontrolle *pCAG*, rot: Überexpression *pCAG-Cre*, E18,5 *p.c.*, AS = Abschnitt, Mittelwert mit SD, für den statistischen Vergleich beider Transfektionen wurden die einzelnen Abschnitte untereinander mit dem Mann-Whitney-Test berechnet, $n = 8$ transfizierte Embryonen je Plasmid, E = Embryonalstadium bei Transfektion, p = Signifikanzwert).



Publikationsverzeichnis

Artikel in Fachzeitschriften

Erstautorenschaft

„C57BL/6-specific conditions for efficient *in utero* electroporation of the central nervous system.“

Jan Baumgart und Nadine Grebe

Journal of Neuroscience Methods, 2015 Januar, PMID: 25445056

Eigenanteil: alle dargestellten Ergebnisse

„Cortex-, hippocampus-, thalamus-, hypothalamus-, lateral septal nucleus- and striatum-specific *in utero* electroporation in the C57BL/6 mouse.“

Jan Baumgart und Nadine Baumgart

Journal of Visualized Experiments, 2015 (in Druck), JoVE53303R2

Eigenanteil: alle dargestellten Ergebnisse

Co-Autorenschaften (*In-utero*-Elektroporation)

„An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration.“

Lehmann SM, Krüger C, Park B, Derkow K, Rosenberger K, Baumgart J, Trimbuch T, Eom G, Hinz M, Kaul D, Habbel P, Kälin R, Franzoni E, Rybak A, Nguyen D, Veh R, Ninnemann O, Peters O, Nitsch R, Heppner FL, Golenbock D, Schott E, Ploegh HL, Wulczyn FG, Lehnardt S.

Nature Neuroscience, 2012 Juni, PMID: 22610069

Eigenanteil: Leitung, Planung und Durchführung der *In-utero*-Elektroporationsversuche

„mir-124-regulated RhoG reduces neuronal process complexity via ELMO/Dock180/Rac1 and Cdc42 signalling.“

Franke K, Otto W, Johannes S, Baumgart J, Nitsch R, Schumacher S.

The EMBO Journal, 2012 Juni 29, PMID: 22588079

Eigenanteil: Planung und Durchführung der *In-utero*-Elektroporationsversuche

„Synaptic PRG-1 modulates excitatory transmission via lipid phosphate-mediated signaling.“
Trimbuch T, Beed P, Vogt J, Schuchmann S, Maier N, Kintscher M, Breustedt J, Schuelke 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, Nitsch R.
Cell, 2009 September 18, PMID: 19766573, Erratum (2011) September 16, 146(6):1043.
Eigenanteil: Leitung, Planung und Durchführung der *In-utero*-Elektroporationsversuche

„Sirt1 contributes critically to the redox-dependent fate of neuronal progenitors.“
Prozorovski T, Schulze-Topphoff U, Glumm R, Baumgart J, Schröter F, Ninnemann O, Siegert E, Bendix I, Brüstle O, Nitsch R, Zipp F, Aktas O.
Nature Cell Biology, 2008 April, PMID: 18344989
Eigenanteil: Leitung, Planung und Durchführung der *In-utero*-Elektroporationsversuche

„The neural EGF family member CALEB/NGC mediates dendritic tree and spine complexity.“
Brandt N, Franke K, Rasin MR, Baumgart J, Vogt J, Khurlev S, Hassel B, Pohl EE, Sestan N, Nitsch R, Schumacher S.
The EMBO Journal, 2007 Mai 2, PMID: 17431398
Eigenanteil: Planung und Durchführung der *In-utero*-Elektroporationsversuche

Poster und Vortrag:

Poster

“Lipid phosphate phosphatases involved in cortical layering during embryonic development”
Baumgart J, Velmans T., Savaskan N.E., Nitsch R. and Bräuer A.U.
Rhine-Main Neuroscience Network (rmn²)-Meeting, 24-26.11.2010, Oberwesel (Deutschland)
Posterpräsentation

Vortrag

“*In-utero*-Elektroporation (IUE) - Eine Methode zur Studie der embryonalen Entwicklung im zentralen Nervensystem der Maus“
Jan Baumgart, 25.06.2009, 38. Seminar über Versuchstiere und Tierversuche, 2009, Berlin, elektronische Veröffentlichung unter der Gesellschaft für Versuchstierkunde GV-Solas

Danksagung

Hiermit sei all denen gedankt, die mich beim Erstellen dieser Arbeit auf vielfältigste Weise unterstützt haben und diese Arbeit mit ihren großen oder auch kleinen Beiträgen erst ermöglicht haben. Besonderer Dank gilt jedoch meinem Betreuer Professor Robert Nitsch und aus meiner ehemaligen Arbeitsgruppe Nikolai Schmarowski, Melanie Pfeifer und David Baska.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Mainz, den 10.09.2015

Jan Baumgart