

**Funktion und Expression von Plasticity Related Gene 3 und
Lipid Phosphat Phosphatase 1 und -1a während der
Gehirnentwicklung**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

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

vorgelegt von

Tanja Velmans
aus Geldern

Berlin

Dezember 2009

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von November 2005 bis Dezember 2009 im Institut für Zell- und Neurobiologie, Centrum für Anatomie, Charité – Universitätsmedizin Berlin und unter der Leitung von Frau Juniorprof. Dr. Anja U. Bräuer angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel
2. Gutachter: Juniorprof. Dr. Anja U. Bräuer

Disputation am 4. März 2010

Ausdauer wird früher oder später belohnt
- meistens aber später

Wilhelm Busch (1832 – 1908)

Danksagung

Zunächst möchte ich Frau Juniorprof. Dr. Anja Bräuer für die Möglichkeit danken, die Arbeit am Institut für Zell- und Neurobiologie anfertigen zu können, sowie für die Betreuung dieser Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel bedanken, für seine Bereitschaft die Betreuung dieser Arbeit zu übernehmen, sowie das Erstgutachten anzufertigen.

Insbesondere möchte ich mich bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Bräuer für die hilfreiche theoretische und praktische Hilfe bedanken, ganz besonders jedoch bei Olga Kieselmann, Bettina Brokowski, Rike Dannenberg, Nora Ebermann, Jan Csupor, Linda Rocha, Justus Goyn, Anna Soriguera, Luca Coiro sowie Anne Bennert. Bei Olga und Bettina möchte ich mich darüber hinaus auch für die vielen kleinen Ablenkungen jenseits des Laboralltages herzlich bedanken.

Außerdem möchte ich Arne Battefeld, Konstantin Stadler und Dr. Ulf Strauss für die hilfreiche Kooperation und die angeregten Diskussionen danken.

Allen anderen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Zell- und Neurobiologie danke ich für viele Kleinigkeiten und Hilfestellungen, die meinen Laboralltag erleichtert haben. Insbesondere sind dies (in alphabetischer Reihenfolge): Jan Baumgart, Monika Dulinski, Beate Geist, André Gronau, Sascha Johannes, Peter Köhler, Denis Lajkó, Sabine Lewandowski, Ari Liebkowsky, Dr. Olaf Ninnemann, Marni Pollrich, Dr. Karl Roth, Jutta Schüler, Dr. Stefan Schumacher, Gudrun Thomaschek und Dr. Thorsten Trimbuch.

Für die Korrektur dieser Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bei Lina und Arne bedanken. Euere kritischen Anmerkungen und Diskussionen während des Schreibens dieser Arbeit haben mir sehr geholfen.

Ein großer Dank gilt auch meinen Freunden jenseits der Arbeit, insbesondere Simone, Jenny, Claudia und Lina, die mich so manches Mal in den letzten Jahren motiviert und wieder aufgebaut haben.

Mein größter Dank gebührt an dieser Stelle jedoch meiner Familie und meinem Freund Peter für ihr Vertrauen in mich und ihr Verständnis. Ohne euere Unterstützung wäre ich nicht da, wo ich heute bin.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Zusammenfassung	VII
Summary	IX
1 Einleitung	1
1.1 Zellulärer Aufbau des zentralen Nervensystems	1
1.1.1 Gliazellen	1
1.1.2 Neurone	1
1.2 Kortexentwicklung	4
1.2.1 Kortikale Vorläuferzellen	5
1.2.2 Neuronale Migration während der Kortexentwicklung	5
1.2.3 An der Regulation der kortikalen Migration beteiligte Moleküle	7
1.3 Lysophosphatidsäure	8
1.3.1 Auswirkungen von Lysophosphatidsäure	9
1.3.2 Metabolismus von Lysophosphatidsäure	10
1.4 Lipid Phosphat Phosphatasen	11
1.5 Plasticity Related Genes	13
2 Ziel der Arbeit	16
3 Material und Methoden	18
3.1 Material	18
3.1.1 Chemikalien und Zubehör	18
3.1.2 Reagenzien und Enzyme	18
3.1.3 Kits	18
3.1.4 Geräte	19
3.1.5 Software	19
3.1.6 Oligonukleotide	20
3.1.7 Plasmide	23
3.1.8 Peptide	24

3.1.9	Organismen	24
3.1.10	Versuchstiere	24
3.1.11	Antikörper	25
3.1.12	Medien, Puffer und Lösungen	26
3.2	Methoden	28
3.2.1	Zellbiologische Methoden	28
3.2.1.1	Kultur und Passage von Zelllinien	28
3.2.1.2	Kryokonservierung von Zelllinien	28
3.2.1.3	Präparation primärer Neurone	28
3.2.1.4	Transiente Transfektion	29
3.2.1.5	Inhibition von N- und O-Glykosylierungen	30
3.2.2	Molekularbiologische Methoden	30
3.2.2.1	RNA-Extraktion	30
3.2.2.2	Reverse Transkription (RT)	30
3.2.2.3	Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	31
3.2.2.4	Quantitative Real-time RT-PCR	32
3.2.2.5	Gerichtete Mutagenese	32
3.2.2.6	Plasmidisolierung	33
3.2.2.7	Restriktionsverdau	33
3.2.2.8	DNA-Konzentrationsbestimmung und -Sequenzierung	34
3.2.2.9	Agarose-Gelelektrophorese	34
3.2.2.10	Hitzetransformation chemisch kompetenter Bakterien	34
3.2.2.11	Klonierung von Überexpressionsplasmiden	34
3.2.2.12	Klonierung von shRNA-Plasmiden	35
3.2.2.13	Genotypisierung	36
3.2.3	Proteinbiochemische Methoden	36
3.2.3.1	Proteinextraktion	36
3.2.3.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	37
3.2.3.3	Deglykosylierung von Proteinen	37
3.2.3.4	Antikörperaufreinigung	37
3.2.3.5	Immunblot	38
3.2.4	Immunchemische Färbemethoden	39
3.2.4.1	Immunzytochemische Färbungen	39

3.2.4.2	Immunhistochemische Färbungen	39
3.2.5	Mikroskopie und statistische Auswertung	40
3.2.5.1	Konfokale Mikroskopie	40
3.2.5.2	Längenbestimmung von Neuriten	40
3.2.5.3	Quantifizierung der kortikalen Migration	41
3.2.5.4	Statistik	41
4	Ergebnisse	42
4.1	Untersuchungen zu PRG3	42
4.1.1	Aufreinigung und Spezifitätstest polyklonaler Antikörper gegen PRG3	42
4.1.1.1	Auswahl und Affinitätsaufreinigung der PRG3-Antikörper	42
4.1.1.2	Spezifität der aufgereinigten PRG3-Antikörper	44
4.1.2	Posttranslationale Modifikation von PRG3	45
4.1.2.1	N-Glykosylierung von PRG3	45
4.1.2.2	Funktionelle Bedeutung der N-Glykosylierung von PRG3	48
4.1.2.3	O-Glykosylierung von PRG3	49
4.1.3	Endogene PRG3-Expression	50
4.1.3.1	PRG3-Expression in unterschiedlichen Mausgeweben	50
4.1.3.2	PRG3-Expression während der Entwicklung	52
4.1.3.3	PRG3-Expression in Neuronen	54
4.1.3.4	Endogene PRG3-Expression während der neuronalen Differenzierung	55
4.1.4	Intrazelluläre Lokalisation von PRG3 in Neuronen	57
4.1.4.1	Intrazelluläre Lokalisation von GFP-mPRG3 in primären Neuronen	57
4.1.4.2	Intrazelluläre PRG3-Lokalisation in frühen primären Neuronen	58
4.1.4.3	Intrazelluläre PRG3-Lokalisation in reifen primären Neuronen	61
4.2	Untersuchungen zu LPP1 und -1a	65
4.2.1	Aufreinigung und Spezifitätstest polyklonaler Antikörper gegen LPP1 und -1a	65
4.2.1.1	Herstellung von Immunsereen	65
4.2.1.2	Auswahl und Affinitätsaufreinigung der LPP1- und -1a-Antikörper	66
4.2.1.3	Spezifität der aufgereinigten LPP1- und -1a-Antikörper	67
4.2.2	Einfluss von LPP1 und -1a auf die Morphologie von N1E-115-Zellen	70
4.2.2.1	Überexpression von GFP-LPP1 oder -1a in N1E-115-Zellen	70
4.2.2.2	Knockdown von endogenem LPP1 und -1a in N1E-115-Zellen	72

4.2.3	Endogene LPP1- und -1a-Expression	75
4.2.3.1	LPP1 und -1a in unterschiedlichen Mausgeweben	75
4.2.3.2	LPP1 und -1a während der Entwicklung	76
4.2.3.3	LPP1- und -1a-Expression in Neuronen	77
4.2.4	Funktion von LPP1 und -1a während der Kortextentwicklung	79
4.2.4.1	Störung der radialen Kortextmigration an E18,5	79
4.2.4.2	Migrationsstopp der Neurone in den unteren kortikalen Schichten	83
4.2.4.3	Das Radialgliazellnetzwerk ist trotz LPP1/1a-Knockdowns unverändert	85
4.2.4.4	Migrationsstart der Neurone aus der (sub)ventrikulären Zone	86
4.2.4.5	Einfluss auf Zellzyklus und Proliferation neuronaler Vorläuferzellen	91
5	Diskussion	94
5.1	PRG3	94
5.1.1	Glykosylierung von PRG3	94
5.1.2	PRG3-induzierte Filopodienbildung	95
5.1.3	PRG3-Expression	96
5.1.4	Intrazelluläre Lokalisation von PRG3 in primären Neuronen	99
5.2	LPP1 und -1a	102
5.2.1	Einfluss von LPP1 und -1a auf die Neuritenlänge von N1E-115-Zellen	102
5.2.2	Endogene LPP1- und -1a-Expression	104
5.2.3	Radiale Kortextmigration von Neuronen mit LPP1/1a-Knockdown	106
5.3	Ausblick	113
6	Literatur	114
7	Publikationen und Präsentationen	128
8	Lebenslauf	130
9	Eidesstattliche Erklärung	132

Abkürzungsverzeichnis

APC	„Adenomatous polyposis coli-Protein“
Benzyl-Gal-NAc	Benzyl-2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosid
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
Brn2	„Transcription Factor Brain2“
C1P	Ceramid-1-phosphat
CRMP2	„Collapsin response mediator-Protein-2“
DAG	Diacylglycerol
E	Embryonaltag
Eif1a	Eukaryotischer Translations-Initiations-Faktor 1a
Endo H	Endoglykosidase H
FKS	Fötales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP	„Glial Fibrillary Acidic Protein“
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GSK-3 β	Glykogen Synthase Kinase-3-beta
HA	Hämagglutinin
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase
IB	Immunblot
Iba1	„Ionized calcium binding adaptor molecule 1“
ICC	Immunzytochemie
IHC	Immunhistochemie
IZ	Intermediärzone
KP	Kortikale Platte
LPA	Lysophosphatidsäure
LPP	Lipid Phosphat Phosphatase
LPR	„Lipid Phosphatase-related Protein“
LPT	Lipid Phosphatasen/Phosphotransferasen
MAG	Monoacylglycerol
MAP2	Mikroubuli-assoziiertes Protein 2
MZ	Marginalzone
mESZ	Embryonale Mausstammzellen
m	Maus
M-Phase	Mitose-Phase
n.s.	nicht signifikant

P	postnataler Tag
PA	Phosphatidat
PAP	„Phosphatidic acid phosphatase“
PB	„Phosphate buffer“
PBS	„Phosphate buffered saline“
PCR	„Polymerase chain reaction“
PFA	Paraformaldehyd
Phospho-H3	Phospho-Histon-H3
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PLA	Phospholipase A
PLD	Phospholipase D
PNGase F	Peptid N-Glykosidase F
PRG	„Plasticity Related Gene“
PSD95	„Post synaptic density 95“
r	Ratte
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Reverse Transkriptase
S1P	Sphingosin-1-phosphat
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
shRNA	„Short hairpin RNA“
siRNA	„Small interfering RNA“
S-Phase	Synthese-Phase
SVZ	Subventrikuläre Zone
TG	transgen
Tbr1	„T box transcription factor1“
Tuj1	Neuronen-spezifisches Klasse III β -Tubulin
U	„Unit“
VGAT1	Vesikulärer GABA-Transporter1
VGLUT1	Vesikulärer Glutamat-Transporter1
VZ	Ventrikuläre Zone
WT	Wildtyp

Zusammenfassung

In den letzten Jahren gab es zunehmend Hinweise, dass bioaktive Phospholipide während der Gehirnentwicklung eine wichtige Rolle spielen. Extra- und intrazelluläre Phospholipidspiegel werden sowohl von Phospholipid-synthetisierenden als auch -degradierenden Enzymen reguliert. In diesem Zusammenhang wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von Proteinen der Familie der Lipid Phosphatasen/Phosphotransferasen, die an der Regulation des Phospholipidspiegels beteiligt sind, während der Gehirnentwicklung bzw. der Differenzierung von Neuronen am Beispiel von Plasticity Related Gene 3 (PRG3) und Lipid Phosphat Phosphatase 1 und -1a (LPP1 und -1a) untersucht.

Plasticity Related Genes wurden vor einigen Jahren im Rahmen einer Untersuchung zur Entdeckung neuer Proteine identifiziert, die an Regenerationsprozessen im zentralen Nervensystem beteiligt sind. Über die Expression und Funktion von PRG3 ist bisher nur sehr wenig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PRG3 auf der zweiten extrazellulären Schleife am Asparagin 163 N-glykosyliert wird und dass diese N-Glykosylierung einen Einfluss auf die Plasmamembranlokalisation und die PRG3-induzierte Filopodienbildung *in vitro* hat. PRG3 weist eine weitgehend gehirnspezifische Expression auf, mit der stärksten Expression in späten embryonalen und frühen postnatalen Stadien. Innerhalb des Gehirns konnte PRG3-Protein nur in Neuronen nachgewiesen werden. Des Weiteren deuten die Daten darauf hin, dass PRG3 während der neuronalen Entwicklung *in vitro* eine Rolle spielt: In frühen unreifen Neuronen ist PRG3 vor allem in der Plasmamembran sämtlicher Ausläufer lokalisiert, wobei die stärkste Expression in der Plasmamembran des Neuritenschafts auftritt. In reifen Neuronen wird PRG3 weitgehend axonal exprimiert und kommt hier unter anderem in präsynaptischen Strukturen vor. PRG3 könnte also eine spezifische Funktion wie z.B. die Stabilisierung, Wegfindung oder aktive Konsolidierung von Neuriten zukommen. Hierbei könnte PRG3 als Membranprotein nach Stimulation durch extrazelluläre Signale intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren.

Im Gegensatz zu PRG3 handelt es sich bei LPP1 und -1a um Proteine, die im Hinblick auf ihre biochemischen Eigenschaften in den letzten Jahren genauer untersucht wurden. Ihre Expression und Funktion im zentralen Nervensystem waren aber noch weitgehend unbekannt. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass die Expression von LPP1 und -1a in Neuroblastomzellen einen Einfluss auf die Morphologie dieser Zellen hat. Darüber hinaus konnte eine Expression von LPP1 und -1a im Gehirn nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass LPP1 und -1a die radiale Migration kortikaler Neurone während der

Embryonalentwicklung beeinflussen. Neurone mit einem LPP1/1a-Knockdown migrieren verspätet aus der (sub)ventrikulären Zone in Richtung kortikaler Platte. Auch innerhalb der kortikalen Platte führt der LPP1/1a-Knockdown zu einer im Vergleich zu den Kontrollen veränderten Lokalisation eines Teils dieser Neurone. Neurone mit einem LPP1/1a-Knockdown waren dabei vermehrt in den unteren kortikalen Schichten lokalisiert. Das Radialgliazellnetzwerk, die neuronale Identität der transfizierten Zellen, die Proliferation und der Zellzyklus bleiben davon aber unberührt. LPP1/1a-shRNA-transfizierte Neurone waren darüber hinaus sogar in der Lage, sich morphologisch ihrer Umgebung anzupassen. Es wird vermutet, dass die Funktion von LPP1 und -1a während der radialen Kortextmigration in der Regulation des extra- und/oder intrazellulären Phospholipidspiegels und der damit verbundenen Signaltransduktion zu suchen ist.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse tragen dazu bei, die Funktionen von PRG3 und LPP1 und -1a während der Gehirnentwicklung bzw. der neuronalen Differenzierung genauer einzugrenzen. Die Aufklärung solcher Prozesse, die an der Entstehung und der Funktion des ZNS beteiligt sind, könnte zum Verständnis weiterer Ursachen angeborener Fehlbildungen des Gehirns führen.

Summary

Recently, evidence has been accumulating that phospholipids have a function during brain development. The extracellular and intracellular levels of these phospholipids are controlled by enzymes producing and/or degrading them. This study investigated the phospholipid-modifying enzymes plasticity related gene 3 (PRG3) and lipid phosphate phosphatases 1 and -1a (LPP1 and -1a) during brain development and neuronal differentiation to extrapolate on the influence of the lipid phosphatase/phosphotransferase family.

Plasticity related genes have been found only recently during an investigation to identify proteins involved in regeneration processes in the brain. Therefore, little information on PRG3 expression and function have been available to date. Experiments carried out during the present study showed that PRG3 is N-glycosylated on asparagine 163 on the second extracellular loop. This N-glycosylation has an influence on plasma membrane localisation and PRG3-induced filopodia formation. PRG3 is mainly expressed in the brain with the highest expression in late embryonic and early postnatal stages. Furthermore, the data suggests that PRG3 plays a role during neuronal development. In young immature neurons, PRG3 was localized in the plasma membrane of all neurites with the highest expression level in the neurite shaft. In mature neurons, PRG3 exhibits a mainly axonal expression pattern. Therefore, PRG3 could play a role in processes such as stabilisation, pathfinding and active consolidation of neurites. As a membrane protein, PRG3 could possibly activate intracellular signalling cascades after stimulation by extracellular signals.

In contrast to PRG3, LPP1 and -1a have been characterized in detail concerning their biochemical function. Their expression and function in the central nervous system, however, remained unexplored. In this study, it could be shown that LPP1 and -1a exhibit an outgrowth-associated function in neuronal cell lines and that LPP1 and -1a were expressed in the brain. Knockdown experiments *in utero* showed that LPP1 and -1a influence radial migration of cortical neurons during embryonic development. Neurons with LPP1/1a knockdown showed a delayed migration out of the (sub)ventricular zone into the cortical plate. Moreover, LPP1/1a knockdown led to migration halting in the lower layers of the cortical plate while the radial glial network, neuronal identity of transfected cells, proliferation and cell cycle remained unchanged. Furthermore, LPP1/1a shRNA-transfected neurons were able to adapt morphologically to their environment. During cortex development, LPP1 and -1a are thought to regulate extra- and/or intracellular phospholipid levels and their associated signal transduction pathways.

These findings contribute to the understanding of possible functions of PRG3, LPP1 and -1a during brain development and neuronal differentiation. Elucidation of these processes might help to understand further reasons for congenital malformations of the brain.

1 Einleitung

Das zentrale Nervensystem (ZNS) von Vertebraten besitzt eine hochkomplexe Struktur. Prozesse wie Wahrnehmung, Koordination motorischer Leistungen und die Interaktion mit der Außenwelt hängen von der korrekten Vernetzung aller Neurone ab. Während der Entwicklung dieser Netzwerke spielen eine Reihe zellulärer Vorgänge wie Proliferation, Migration und neuronale Differenzierung eine entscheidende Rolle, an denen eine Vielzahl intrinsischer und extrinsischer Faktoren beteiligt sind. Die Aufklärung dieser Prozesse und Signalwege, die an der Entstehung und der Funktion des ZNS beteiligt sind, könnte zur weiteren Aufklärung der Ursachen angeborener Fehlbildungen des Gehirns führen.

1.1 Zellulärer Aufbau des zentralen Nervensystems

1.1.1 Gliazellen

Das ZNS von Säugetieren besteht hauptsächlich aus Nerven- und Gliazellen, wobei Gliazellen ca. 90 % und Neurone ca. 10 % der Zellen ausmachen [1]. Es gibt drei unterschiedliche Arten von Gliazellen: Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia, denen je nach Zelltyp unterschiedliche Funktionen zukommen [2]. Astrozyten bilden die Mehrheit der Gliazellen im ZNS und haben vor allem eine unterstützende Funktion, indem sie die optimale Umgebung für Neurone bilden und diese über ihre Kontakte zu Blutgefäßen mit Nährstoffen und Ionen versorgen [2, 3]. Oligodendrozyten bilden hauptsächlich Myelin zur elektrischen Isolierung der Neurone, was die Aktionspotenzialweiterleitung beschleunigt [1]. Mikroglia dagegen stellen die Hauptform der aktiven, angeborenen Immunantwort im Gehirn dar. Nach Schädigungen phagozytieren sie potenziell pathogen wirkende Substanzen [2, 4].

1.1.2 Neurone

Die grundlegenden Einheiten des Nervensystems werden jedoch von Neuronen gebildet. Ihre Funktion liegt in der Weiterleitung, Verarbeitung und Speicherung von Informationen. Neurone sind stark polarisierte Zellen mit zwei morphologisch und funktionell unterschiedlichen Arten von Ausläufern. Sie besitzen ein Axon zur Reizweiterleitung und mehrere Dendriten, die auf den Empfang und die Verarbeitung präsynaptischer Signale spezialisiert sind [5, 6]. Das Axon ist morphologisch lang und dünn, während Dendriten kürzer und in der Nähe des Zellkörpers verdickt sind [7]. Die Präsynapsen der Axone enthalten synaptische Vesikel, die zur Reizweiterleitung Neurotransmitter ausschütten.

Dendriten, insbesondere dendritische Dornfortsätze, bei denen es sich um kleine Membranausstülpungen der Dendriten handelt, besitzen an der Postsynapse sowohl Rezeptoren zur Erkennung dieser Neurotransmitter als auch Signalwege zu deren Weiterleitung [8]. Somit sind sowohl das Axon als auch die Dendriten von elementarer Bedeutung für neuronale Funktionen, da sie Neuronen ermöglichen, elektrische Signale zu empfangen und weiterzuleiten.

Kultivierte, primäre Neurone sind ein gut charakterisiertes System zur Untersuchung von Prozessen, die während des Auswachsens von Neuriten sowie bei der Ausbildung der neuronalen Polarität eine Rolle spielen [9-11]. Die dabei ablaufenden morphologischen Veränderungen können in fünf Stadien unterteilt werden (Abbildung 1.1): Kurz nach dem Ausplattieren bilden die Neurone Lamellipodien aus (Stadium 1). Einige Stunden später bilden sich mehrere kurze Ausläufer, die Neuriten genannt werden. Diese Neuriten sind morphologisch identisch und durchlaufen einen ständigen Prozess des Auswachsens und der Retraktion (Stadium 2). Nach ein bis zwei Tagen *in vitro* entwickelt sich einer dieser Neuriten zum rasch auswachsenden Axon, während die Länge der anderen Neuriten sich nicht verändert (Stadium 3). Aus den verbleibenden Ausläufern entwickeln sich wenige Tage später Dendriten (Stadium 4). Anschließend durchlaufen Axon und Dendriten eine kontinuierliche Reifung und bilden synaptische Kontakte zur Weiterleitung elektrischer Signale aus (Stadium 5)[5, 10, 12].

Der entscheidende Schritt der neuronalen Differenzierung ist der Übergang von Stadium 2 zu Stadium 3, währenddessen die Neurone eine polare Morphologie ausbilden [13, 14]. Dieser Prozess erfordert ein koordiniertes Zusammenspiel einer Vielzahl von Signalmolekülen. In den letzten Jahren konnten einige dieser Signalmoleküle identifiziert werden. Darunter befinden sich z.B. GTPasen, Proteine des Par-Komplexes, Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), Glykogen Synthase Kinase-3-beta (GSK3 β), das Adenomatous polyposis coli-Protein (APC) und das Collapsin response mediator-Protein-2 (CRMP2) [6, 10].

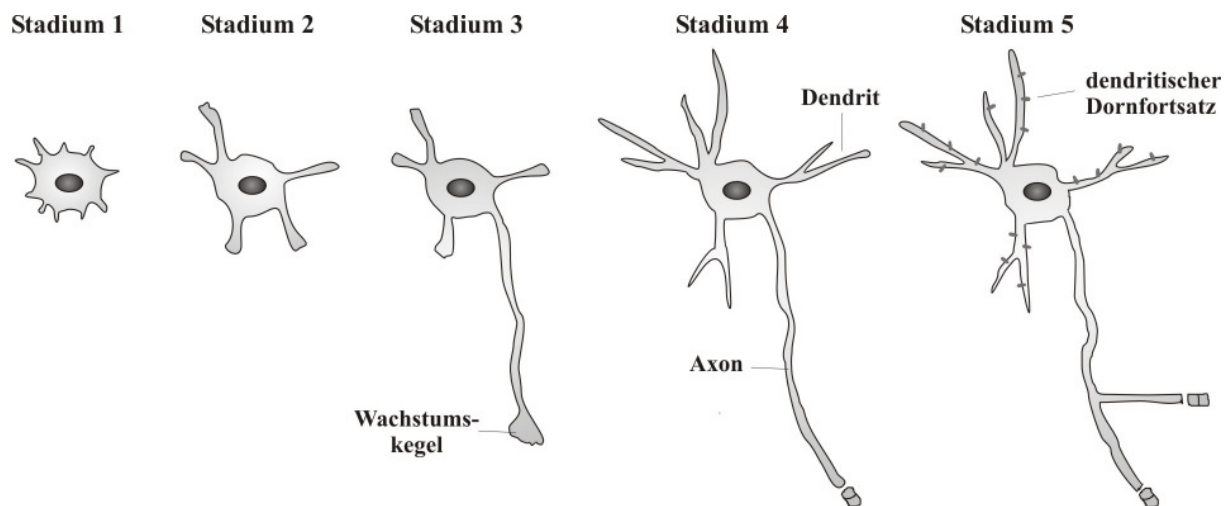


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Entwicklungsstadien primärer hippocampaler Neurone in Kultur. Kurz nach dem Anheften an das Substrat bilden Neurone Lamellipodien aus (Stadium 1). Innerhalb weniger Stunden bilden sich daraus einige undifferenzierte Ausläufer (Stadium 2). Nach ein bis zwei Tagen *in vitro* entwickelt sich einer dieser Neuriten zum auswachsenden Axon, während die Länge der anderen Neuriten sich nicht verändert (Stadium 3). Wenige Tage später differenzieren dann die weiteren Neuriten zu Dendriten (Stadium 4), gefolgt von der Reifung des Axons und der Dendriten und der Ausbildung synaptischer Kontakte (Stadium 5). Modifiziert nach [7].

Während der Entwicklung von Neuronen im ZNS werden Auswachsen und Wegfindung von Neuriten durch Wachstumskegel gesteuert. Wachstumskegel sind sehr bewegliche Strukturen am Ende der Neuriten, die ihre Umgebung sondieren und auf anziehende oder abstoßende Signale mit Bewegung reagieren [9]. Wachstum und Wegfindung von Neuriten werden hierbei durch eine Vielzahl extrazellulärer Proteine wie Ephrine, Semaphorine, Netrin, Slit, und Sonic hedgehog Proteine kontrolliert [15]. Auch Phospholipide wie Lysophosphatidsäure (LPA) oder Sphingosin-1-Phosphat (S1P) können als extrazelluläre Faktoren in diese Prozesse eingreifen [16-18]. Dabei binden sie an Rezeptoren in der Plasmamembran und aktivieren intrazelluläre Signalkaskaden, die unter anderem das Zytoskelett der Neurone beeinflussen [18-20]. Die Reorganisation des Zytoskeletts ist sehr komplex und erfordert eine Reihe von Zytoskelett-assoziierten Proteinen [20]. Die beiden wesentlichen Bestandteile des Zytoskeletts von Neuriten bilden Mikrotubuli und filamentöses Aktin (Mikrofilamente). Während filamentöses Aktin für die Form des Wachstumskegels von Bedeutung ist und dadurch für die Führung bzw. Wegfindung von Neuriten, sind Mikrotubuli wichtig für die Struktur der Neuriten und spielen eine entscheidende Rolle bei deren Verlängerung [19].

Obwohl es sich bei primären Neuronen in Kultur um ein etabliertes System zur Untersuchung des neuronalen Wachstums und der Differenzierung handelt, sind die morphologischen Veränderungen unreifer Neuronen *in vitro* nicht zwangsläufig identisch mit denen *in vivo* [7]. Direkt nach der Zellteilung erkennen Neurone *in vivo* das asymmetrische Milieu ihrer

extrazellulären Umgebung und beginnen mit der Migration in Richtung ihres Bestimmungsorts mit einem leitenden Ausläufer auf der Vorderseite und einem nachgezogenen Ausläufer auf der Rückseite der Zelle. Der Zeitpunkt, zu dem sich Axon und Dendriten ausbilden, variiert zwischen den einzelnen Neuronenarten in unterschiedlichen Gehirnbereichen [7]. So werden z.B. kortikale Pyramidenzellen in der ventrikulären Zone gebildet und migrieren entlang der Radialglia zu ihrem Bestimmungsort innerhalb der kortikalen Platte. Dabei besitzen sie einen führenden Hauptausläufer und ein nach unten, in Richtung Ventrikel gerichtetes Axon, das dem migrierenden Neuron folgt [7, 21].

1.2 Kortexentwicklung

Die Entwicklung des Nervensystems von Säugetieren beginnt mit der Bildung der Neuralplatte aus Zellen des Ektoderms. Durch Faltung der Neuralplatte bildet sich das Neuralrohr, aus dem sich schließlich das gesamte Nervensystem entwickelt. Das vordere Ende des Neuralrohrs bildet hierbei die Grundlage des Gehirns, während aus dem hinteren Ende das Rückenmark entsteht [22]. Zellteilung und -differenzierung innerhalb des Neuralrohrs führen zur Ausbildung differenzierter Zellpopulationen wie Neurone und Gliazellen [22].

Der zerebrale Kortex entsteht während der frühen Embryonalentwicklung aus dem vordersten Teil des Neuralrohrs, dem Prosencephalon, das sich später in Telencephalon und Diencephalon teilt [23-25]. Die dorsale Region des Telencephalons bildet den zerebralen Kortex, der aus Neokortex, Paleokortex und Archikortex (mit Hippocampus) besteht [25, 26]. Der Kortex von Säugetieren besitzt eine laminare Struktur und kann funktionell in unterschiedliche Areale unterteilt werden. Diese Areale weisen spezialisierte Funktionen wie sensorische Wahrnehmung, kognitive Fähigkeiten oder motorische Kontrolle auf [27-29]. Im adulten Stadium besteht der Mausneokortex aus sechs Schichten und besitzt eine komplexe, gut organisierte Struktur aus verschiedenen Neuronen- und Gliazelltypen [28]. Zur Ausbildung dieser einzelnen Schichten differenzieren während der Embryonalentwicklung kortikale Vorläuferzellen in der (sub)ventrikulären Zone zu postmitotischen Neuronen, die dann anschließend in die kortikale Platte migrieren [30]. Eine korrekte Ausbildung der sechs Schichten und der unterschiedlichen Areale ist notwendig, da es sich hierbei nicht nur um ein Zellverteilungsmuster handelt, sondern die Neurone einer jeden Schicht und eines jeden Areals unterschiedliche Eigenschaften und Funktionen bei der Verschaltung des neuronalen Netzwerks besitzen [31, 32].

1.2.1 Kortikale Vorläuferzellen

Während der Entwicklung des Kortex werden Neurone aus neuronalen Vorläuferzellen durch symmetrische und asymmetrische Zellteilung gebildet [30, 33]. Die Vorläuferzellen lassen sich dabei in drei unterschiedliche Arten unterteilen: Neuroepithelzellen, Radialgliazellen und intermediäre Vorläuferzellen [28]. Zu Beginn der Entwicklung teilen sich Neuroepithelzellen größtenteils durch symmetrische Zellteilung, um den Pool multipotenter Vorläuferzellen zu vergrößern. Ein kleiner Teil der Neuroepithelzellen durchläuft eine asymmetrische Zellteilung und bildet die ersten Neurone [33]. Mit fortschreitender Neurogenese entstehen aus Neuroepithelzellen Radialgliazellen und intermediäre Vorläuferzellen. Radialglia bilden das Gerüst, entlang dessen Neurone zu ihrem Bestimmungsort innerhalb der kortikalen Platte migrieren. Sie besitzen lange Fortsätze, die sich aus der ventrikulären Zone bis zur Pia mater erstrecken [23, 28, 34]. Darüber hinaus können aus Radialgliazellen durch Zellteilung Neurone oder intermediäre Vorläuferzellen entstehen. Intermediäre Vorläuferzellen entstehen in der ventrikulären Zone. In späteren Stadien der Neurogenese bilden sie oberhalb dieser Zone die sogenannte subventrikuläre Zone aus. Aus intermediären Vorläuferzellen in der subventrikulären Zone entstehen durch symmetrische Teilung jeweils zwei neuronale Tochterzellen [30, 33, 34]. Nach der Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen in postmitotische Neurone verlassen diese die (sub)ventrikuläre Zone und migrieren in die kortikale Platte, wo sie morphologisch und funktionell ausdifferenzieren und synaptische Kontakte ausbilden [30, 31].

1.2.2 Neuronale Migration während der Kortextentwicklung

Kortikale Neurone besitzen unterschiedliche morphologische und funktionelle Eigenschaften und können in zwei große Klassen unterteilt werden: Interneurone und Projektionsneurone [28, 31, 32, 34]. GABAerge Interneurone werden aus Vorläuferzellen im ventralen Telencephalon gebildet. Von dort aus migrieren sie in tangentialer Bewegungsrichtung in den Kortex (Abbildung 1.2) [28, 35]. Projektionsneurone sind glutamaterg und besitzen eine charakteristische Pyramidenform. Sie übermitteln Informationen zwischen unterschiedlichen Kortexregionen oder in andere Regionen des Gehirns. Während der Entwicklung entstehen sie aus Vorläuferzellen in der kortikalen ventrikulären und subventrikulären Zone und migrieren in radialer Richtung, d.h. von innen nach außen, zu ihrem Bestimmungsort in Richtung der Pia mater (Abbildung 1.2) [26, 28, 35]. Projektionsneurone bilden die zahlenmäßig

vorherrschende Klasse, da sie ca. 75 - 90 % aller kortikaler Neurone ausmachen [23, 32], weshalb im Folgenden ausführlicher auf die radiale Migration eingegangen wird.

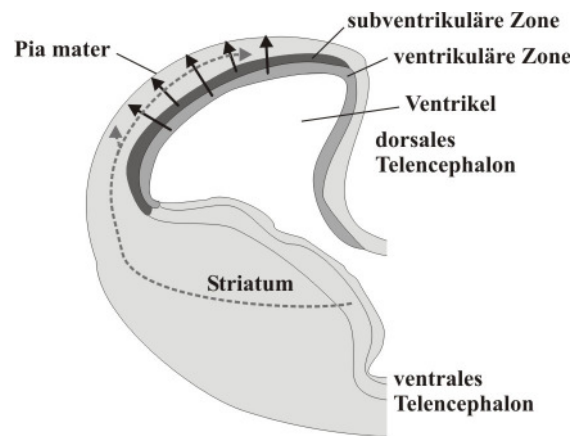


Abbildung 1.2: Migrationsverhalten kortikaler Neurone. Interneurone werden im ventralen Telencephalon gebildet und migrieren tangential in die kortikale Platte des dorsalen Telencephalons (gestrichelter, grauer Pfeil). Projektionsneurone entstehen in der kortikalen ventrikulären und subventrikulären Zone und migrieren in radialer Bewegungsrichtung in die kortikale Platte (schwarze Pfeile). Modifiziert nach [35].

Die Ausbildung der neuronalen Schichtung des Neokortex durch radiale Migration findet in Mausembryonen zwischen Embryonaltag 11 und 18 (E11 und E18) statt [34]. An E11 besteht der Neokortex aus einer Vielzahl proliferierender Vorläuferzellen in der ventrikulären Zone. Eine Welle postmitotischer Neurone verlässt die ventrikuläre Zone und migriert radial in Richtung der Pia mater und bildet dort die sogenannte „Preplate“. An E13 migriert eine zweite Welle postmitotischer Neurone radial aus der ventrikulären Zone und spaltet die „Preplate“ in die oberflächliche Marginalzone und die tiefer liegende „Subplate“. Dadurch bildet die zweite Welle von Neuronen eine Schicht zwischen Marginalzone und „Subplate“, die sogenannte kortikale Platte [26, 28, 34]. Zwischen E14 und E18 verlassen fortlaufend weitere Wellen postmitotischer Neurone die ventrikuläre Zone, migrieren radial durch die „Subplate“ und bilden die einzelnen Schichten der kortikalen Platte aus. Dabei läuft die Schichtung der kortikalen Platte von innen nach außen ab. Dies bedeutet, dass früher geborene Neurone die unteren kortikalen Schichten bilden, während später geborene Neurone durch diese Schichten hindurch in die oberen Schichten der kortikalen Platte wandern [28, 31, 34]. Dieser Vorgang ist in Abbildung 1.3 schematisch dargestellt.

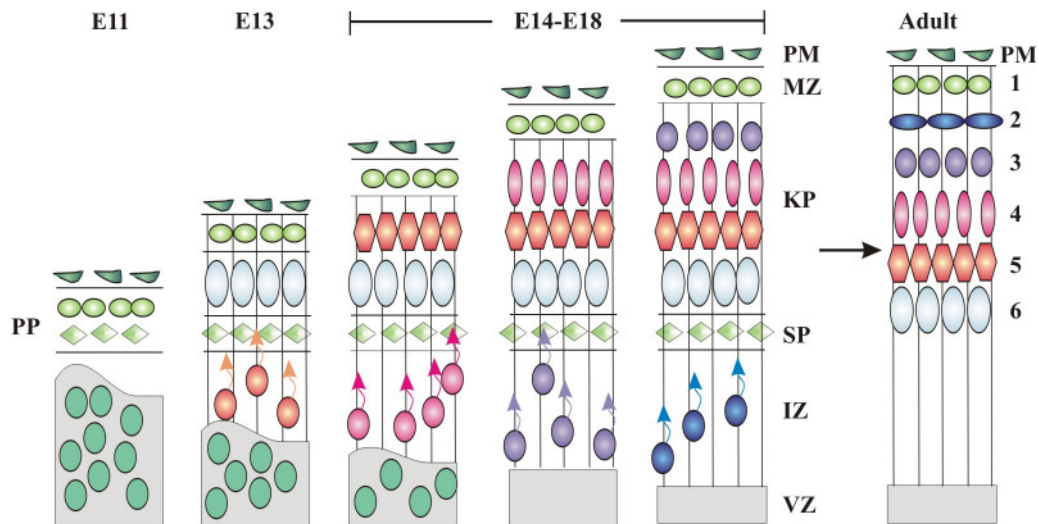


Abbildung 1.3: Ausbildung der kortikalen Schichtung in Mausembryonen. Der adulte Neokortex besteht aus sechs Schichten. Die radiale Migration verläuft entlang von Radialgliazellen (dargestellt als vertikale Striche). Bei E11 hat sich die sogenannte „Preplate“ (PP) ausgebildet. An E13 verlässt eine Welle postmitotischer Neurone die ventrikuläre Zone (VZ) und migriert radial in Richtung Pia mater (PM). Diese Neurone spalten die „Preplate“ in Marginalzone (MZ) und „Subplate“ (SP) und bilden somit die kortikale Platte (KP). Zwischen E14 und E18 wandern weitere Neurone in die kortikale Platte und siedeln sich unterhalb der Marginalzone an, wodurch nach und nach der sechsschichtige Neokortex entsteht. Modifiziert nach [34].

Während der Kortextentwicklung unterscheidet man zwischen zwei Arten der radialen Migration: die nukleäre Translokation und die Lokomotion [24, 26, 30]. Die nukleäre Translokation findet in den frühen Stadien der Kortextentwicklung statt. Der Zellkörper wandert hierbei in Richtung der Pia mater, wo der führende Hauptausläufer dieser Neurone verankert ist. Somit verkürzt sich dieser Hauptausläufer kontinuierlich im Laufe der Translokation [24, 26]. In späteren Stadien erreichen postmitotische Neurone ihren Bestimmungsort in der kortikalen Platte vermehrt durch Lokomotion, da mit zunehmender Dicke der kortikalen Platte eine nukleäre Translokation durch die gesamte Breite der kortikalen Platte nicht mehr möglich ist. Bei der Lokomotion migrieren die Neuronen entlang der Radialglia zu ihrem Bestimmungsort. Der Zellkörper bewegt sich gemeinsam mit dem führenden Hauptausläufer fort, weshalb die Länge des Hauptausläufers während der Lokomotion konstant bleibt [24, 26, 34].

1.2.3 An der Regulation der kortikalen Migration beteiligte Moleküle

Migrationsstörungen kortikaler Neurone beim Menschen führen zu schweren Fehlbildungen des Gehirns wie Lissenzephalie, subkortikale Bandheterotopie, Polymikrogyrie mit fehlender Schichtung oder Heterotopie [32, 34, 36]. Diese Fehlbildungen treten meist als Folge genetischer Mutationen auf und verursachen zum Teil sehr schwere Entwicklungsstörungen und Anfallsleiden (Übersicht in Tabelle 1.1) [23, 32].

Tabelle 1.1: Neuronale Migrationsstörungen und dafür verantwortliche Gene.

<i>Gen</i>	Krankheit	Gen-Lokus	Symptome	Referenz
<i>LIS1</i>	Isolierte Lissenzephalie und Miller-Dieker-Syndrom	17p13.3	Entwicklungsstörungen, Epilepsie, eingeschränkte Lebenserwartung	[37, 38]
<i>DCX</i>	Isolierte Lissenzephalie bei Männern und subkortikale Bandheterotopie bei Frauen	Xq22.3-23	Entwicklungsstörungen, Epilepsie	[39]
<i>Reelin</i>	Lissenzephalie mit zerebellärer Hypoplasie	7q22	Entwicklungsstörungen, Hypotonie, Epilepsie, Kurzsichtigkeit	[40]
<i>Filamin A</i>	Periventriculäre noduläre Heterotopie	Xq28	Epilepsie	[41]
<i>Fukutin</i>	Fukuyama-kongenitale Muskeldystrophie	9q31	Entwicklungsstörungen, Epilepsie, Muskeldystrophie	[42]
<i>POMGnT1</i>	„Muscle-Eye-Brain“-Erkrankung	1p32-34	Entwicklungsstörungen, Augenfehlbildungen, Muskeldystrophie	[43]

Die Analyse von Mutationen, die kortikalen Fehlbildungen beim Menschen zugrunde liegen, haben in der Vergangenheit wichtige Anhaltspunkte über Gene geliefert, die eine maßgebliche Rolle bei der neuronalen Migration spielen. Aufgrund dieser Erkenntnisse konnten Studien in Mausmodellen durchgeführt werden, die zur Identifizierung weiterer Moleküle und deren Rolle in der kortikalen Migration führten [34]. Dazu zählen Adhäsionsmoleküle wie Integrine [44, 45] und Astrotactin [46], Mikrotubuli-assoziierte Proteine wie Lis1 [47] und Doublecortin [48, 49] oder Kinasen wie die Cyclin-abhängige Kinase 5 [50, 51]. Daneben gibt es eine Reihe extrazellulärer Proteine, die Neurone während der kortikalen Migration leiten, indem sie intrazelluläre Signalkaskaden beeinflussen und dadurch das Zytoskelett der Neurone verändern [23, 52]. Hierzu gehören zum einen Proteine der extrazellulären Matrix wie Reelin [53] und Laminin [54], zum anderen leiten Gradienten extrazellulärer Signalmoleküle wie z.B. Semaphorine kortikale Neurone bei der radialen Migration über längere Distanzen hinweg zu ihrem Bestimmungsort [23, 55]. Außer Proteinen können auch bioaktive Phospholipide wie LPA als Signalmoleküle während der Kortextentwicklung wirken (siehe Kapitel 1.3.1) [56-58].

1.3 Lysophosphatidsäure

Lysophosphatidsäure (LPA, 1-Acyl-Glycerol-3-Phosphat) ist ein bioaktives Phospholipid mit breiten biologischen Wirkungsspektrum. Es wird mit so unterschiedlichen Prozessen wie Gehirnentwicklung [56, 58], Wundheilung [59, 60], Gefäßumbau [61, 62] und Tumorentwicklung [63] in Zusammenhang gebracht. LPA ist sowohl in biologischen

Flüssigkeiten wie Serum, Plasma und Liquor als auch in Geweben einschließlich dem Gehirn nachweisbar [64, 65].

1.3.1 Auswirkungen von Lysophosphatidsäure

Extrazelluläres LPA kann verschiedene Zellreaktionen über spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auslösen. Bisher sind fünf LPA-spezifische Rezeptoren bekannt: LPA₁, LPA₂, LPA₃, LPA₄ und LPA₅ [16, 64]. Außerdem wird angenommen, dass drei weitere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPR87, P2Y5 und P2Y10) auf LPA reagieren [66-68]. LPA-Rezeptoren werden in fast allen Geweben, einschließlich dem Gehirn, exprimiert [16, 69]. Die meisten Zelltypen exprimieren mehrere LPA-Rezeptortypen und jeder Rezeptortyp kann verschiedene G-Proteine binden, sodass eine Reihe unterschiedlicher Signalkaskaden aktiviert werden können [16, 70]. Das führt dazu, dass LPA in verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Reaktionen wie Migration [59], Proliferation [71], Zellüberleben [72] und Zellrundung [73, 74] auslösen kann.

Auch die Rolle von LPA während der neuronalen Entwicklung ist sehr komplex und abhängig vom Entwicklungsstadium, der LPA-Konzentration und den Umgebungsbedingungen [16]. In neuronalen Vorläuferzellen und jungen postmitotischen Neuronen induziert LPA eine rasche Neuritenretraktion und Zellrundung [57, 75], während mit zunehmender Reifung der Neurone diese Reaktionen durch einen LPA-induzierten Kollaps der Wachstumskegel abgelöst werden [76].

Es wird vermutet, dass LPA während der Kortextentwicklung von postmitotischen Neuronen in der kortikalen Platte sezerniert wird. Dies könnte zu einer Aktivierung der LPA-Rezeptoren, insbesondere des LPA₁, führen, der verstärkt von Zellen in der ventrikulären Zone exprimiert wird [16]. Hierdurch werden intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, die zu Neuritenretraktion, Zellrundung und Zellkernmigration der Vorläuferzellen führen (Abbildung 1.4) [56]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass LPA die Migration junger postmitotischer Neurone *in vivo* beeinflusst [57]. Kultivierung intakter zerebraler Kortizes mit LPA führt zu einer raschen Zunahme der Kortextbreite und der Ausbildung kortikaler Falten, die Gyri ähneln [58]. Gyri treten in der Regel hauptsächlich in größeren Gehirnen höher entwickelter Säugetieren zur Ausdehnung der kortikalen Oberfläche auf und kommen normalerweise in Mäusen nicht vor [77].

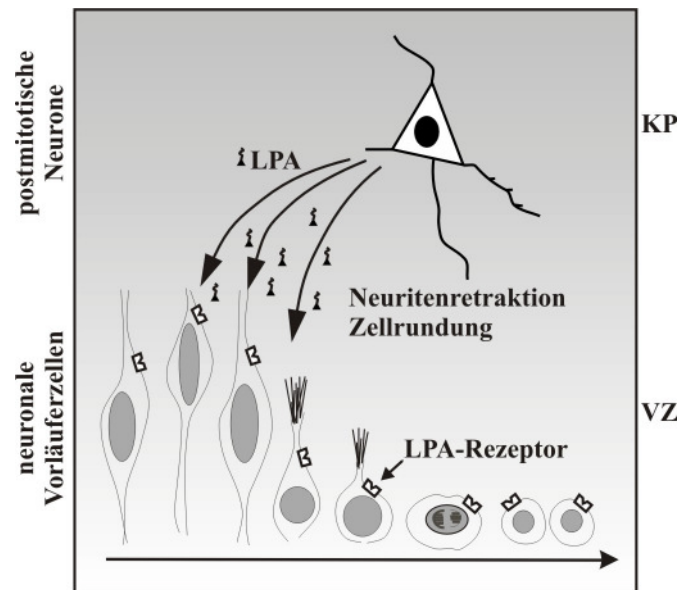


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung einer möglichen Funktion von LPA während der Kortexentwicklung. Extrazelluläres LPA wird von postmitotischen Neuronen in der kortikalen Platte (KP) produziert und interagiert mit den LPA-Rezeptoren auf der Zelloberfläche neuronaler Vorläuferzellen in der ventrikulären Zone (VZ). Die daraus resultierende Aktivierung der G-Protein-gekoppelten Signaltransduktion führt zu Neuritenretraktion und Zellrundung. Modifiziert nach [56].

1.3.2 Metabolismus von Lysophosphatidsäure

LPA kann auf unterschiedlichen Wegen synthetisiert werden. Extrazelluläres LPA kann durch Deacylierung von Phosphatidat (PA) mittels Phospholipase A₁ und A₂ (PLA₁ und PLA₂) gebildet werden. Der Hauptweg der extrazellulären LPA-Synthese ist aber die Spaltung von Lysophosphatidylcholin durch Autotaxin (auch Lysophospholipase D genannt, Abbildung 1.5) [17, 78]. Intrazellulär wird LPA entweder durch intrazelluläre PLA₁- und PLA₂-Aktivität mittels Monoacylglycerolkinase aus Monoacylglycerol (MAG) oder mittels Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase aus Glycerol-3-Phosphat synthetisiert [17]. Auch der Abbau und die daraus resultierende Inaktivierung von LPA kann durch unterschiedliche Enzyme katalysiert werden. So dephosphorylieren Lipid Phosphat Phosphatasen (LPPs) LPA zu MAG (Abbildung 1.5) [79, 80]. Zudem kann LPA durch die LPA-Acyltransferase zu PA umgebaut werden [22, 81].

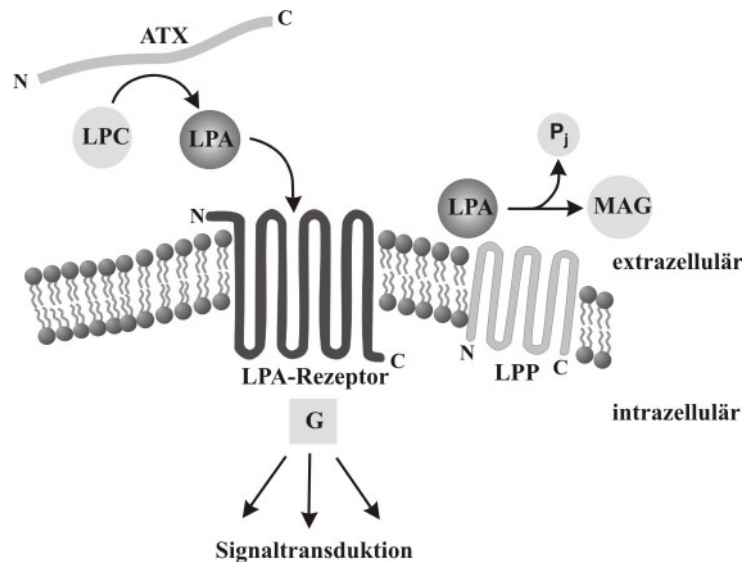


Abbildung 1.5: Extrazellulärer LPA-Metabolismus. Lysophosphatidsäure (LPA) wird extrazellulär mittels Autotaxin (ATX) aus Lysophosphatidylcholin (LPC) synthetisiert und kann über G-Protein-gekoppelte LPA-Rezeptoren Signaltransduktionsprozesse in der Zelle auslösen. Der extrazelluläre LPA-Spiegel wird von Lipid Phosphat Phosphatasen (LPP) kontrolliert, die LPA zu Monoacylglycerol (MAG) dephosphorylieren und somit inaktivieren können. Modifiziert nach [63, 64].

1.4 Lipid Phosphat Phosphatasen

LPPs (auch bekannt als type 2 phosphatidic acid phosphatases, PAP2) gehören zur Familie der Lipid Phosphatasen/Phosphotransferasen (LPT). Die LPT-Familie besteht aus fünf Untergruppen homologer Proteine, zu denen neben den LPPs die Plasticity Related Genes (PRG), die Sphingosin Phosphat Phosphatasen (SPP), die Sphingomyelin Synthasen (SMS) und die Typ 2 Kandidat Sphingomyelin Synthasen (CSS2) gehören. Die einzelnen Untergruppen unterscheiden sich voneinander u.a. in ihrer enzymatischen Aktivität und Substratspezifität [80, 82].

LPPs sind Enzyme, die Substrate wie PA, LPA, S1P und Ceramid-1-phosphat (C1P) dephosphorylieren [83]. Sie regulieren die Signaltransduktion von Zellen, indem sie das Verhältnis von Lipidphosphaten zu ihren dephosphorylierten Produkten verändern [80, 82, 84]. LPPs sind membranständig und besitzen sechs transmembranäre Domänen, deren katalytische Zentren auf der zweiten und dritten extrazellulären Schleife liegen [85]. Sie werden sowohl in der Plasmamembran als auch in intrazellulären Membranen exprimiert. Das katalytische Zentrum befindet sich dabei auf der äußeren Oberfläche der Plasmamembran oder im Lumen der intrazellulären Membrankompartimente (Abbildung 1.6) [82]. LPPs bilden Homo- und Heterooligomere, die im Gegensatz zur monomeren Form, katalytisch aktiv sind [86].

In Säugetieren existieren drei verschiedene LPP-Isoformen (LPP1, LPP2, LPP3) und eine alternative Spleißvariante (LPP1a) [79, 80, 84]. Bei LPP1 und -1a handelt es sich um Spleißvarianten, bei denen das zweite Exon differenziell gespleißt wird. Dies betrifft die Aminosäuren auf der ersten extrazellulären Schleife (Abbildung 1.6, dunkelgrau) [87]. Es wird vermutet, dass die differenziell gespleißte Region für die Substraterkennung oder die Lokalisation des Proteins innerhalb der Plasmamembran von Bedeutung ist [88, 89].

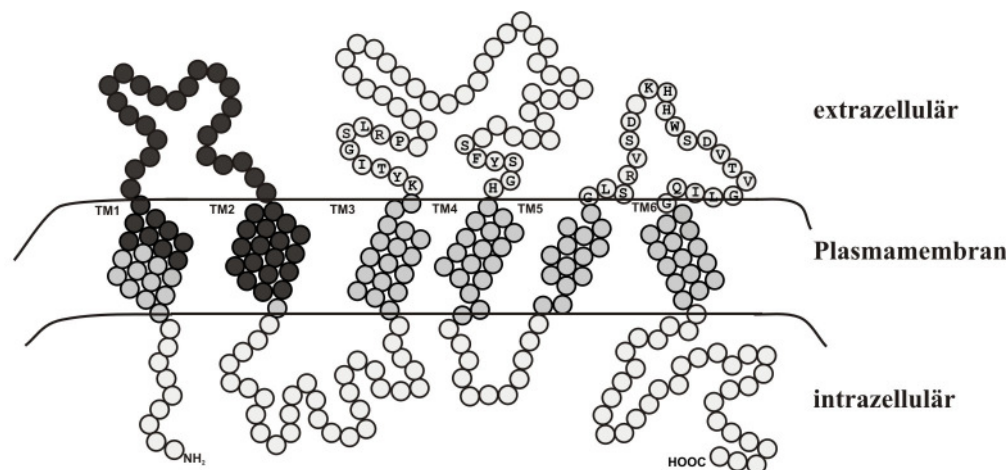


Abbildung 1.6: Kugelmodell von mLPP1 und -1a. Dunkelgrau markiert sind die Aminosäuren, in denen LPP1 und -1a differenziell gespleißt werden. Aminosäuren der katalytischen Domänen auf der zweiten und dritten extrazellulären Schleife wurden mit schwarzen Buchstaben markiert. Modifiziert nach [85].

Während eine Expression von LPP1, -1a und -3 in fast allen Geweben nachgewiesen werden konnte [87, 90, 91], weist LPP2 ein eingeschränkteres Expressionsmuster auf. Die stärkste LPP2-Expression ist in Pankreas und Plazenta nachgewiesen worden [92]. Diese Ergebnisse beruhen größtenteils auf semiquantitativen mRNA-Analysen, wobei zumindest auf mRNA-Ebene, alle LPPs als im Gehirn exprimiert beschrieben sind [87, 90, 92]. Darüber hinaus ist vor allem die Expression von LPP1 und -1a bisher nur anhand semiquantitativer Northern Blots verschiedener Gewebe analysiert worden.

In der Literatur werden zwei unterschiedliche LPP-Funktionen diskutiert. Zum einen wirken LPPs als Ektoenzyme, indem sie extrazellulär bioaktive Phospholipide dephosphorylieren und dadurch inaktivieren bzw. neue Lipidmetabolite generieren, die wiederum andere biologische Funktionen besitzen können. LPPs sind somit ein negativer Regulator einer rezeptorabhängigen Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden durch bioaktive Phospholipide [79, 93, 94]. Zum anderen wird angenommen, dass LPPs auch eine Rolle bei der Kontrolle des intrazellulären Lipidmetabolismus spielen [80, 82, 84]. Sie regulieren das Gleichgewicht zwischen intrazellulärem PA und Diacylglycerol (DAG) und somit die durch

diese Lipide ausgelöste Signaltransduktion. Außerdem beeinflussen LPPs die Bildung von intrazellulärem PA durch die Phospholipase D (PLD) [59, 95].

Bisher stammen die meisten Daten zur Funktion von LPPs aus Experimenten *in vitro*. In den letzten Jahren wurden aber zunehmend Untersuchungen im Mausmodellen zur Aufklärung der LPP-Funktion während der Entwicklung *in vivo* durchgeführt. Mäuse mit einem LPP2-Knockout sind lebens- und zeugungsfähig ohne offensichtlichen Phänotyp [96]. Im Gegensatz dazu ist ein LPP3-Knockout in Mäusen embryonal letal. LPP3-Knockoutmäuse sterben um den Embryonaltag 9,5 (E9,5) aufgrund von Defekten bei der Gefäßausbildung [97]. LPP1-Knockoutmäuse, die durch „Gene-trapping“, zwischen Exon 1 und 2, erzeugt wurden, sind wie LPP2-Knockoutmäuse lebens- und zeugungsfähig. Sie sind phänotypisch unauffällig, weisen aber in einigen Geweben eine deutliche Reduktion der LPA-Phosphataseaktivität und ein erhöhtes Plasma-LPA-Level auf. Während die LPP1-Expression in den meisten Geweben deutlich reduziert ist, zeigt sich die Expression im Gehirn aus unerklärlichen Gründen im Vergleich zu Wildtypmäusen unverändert [98]. Weiterhin existieren Mäuse mit einer transgenen Überexpression von LPP1. Diese sind im Vergleich zu Wildtypmäusen kleiner und haben Probleme bei der Spermatogenese und dem Fellwachstum [99]. Untersuchungen zur Funktion von LPPs im ZNS wurden bisher nicht durchgeführt.

1.5 Plasticity Related Genes

Zur Identifikation molekularer Mechanismen, die an Regenerationsprozessen im ZNS beteiligt sind, wurde von der Arbeitsgruppe Nitsch ein Differential Display Screening nach Entorhinaler Kortexläsion durchgeführt. Die entorhinale Kortexläsion ist ein gut etabliertes Modell zur Analyse der durch eine Läsion ausgelösten neuronalen Plastizität [100, 101]. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte ein bis dahin unbekanntes Protein identifiziert werden, das Plasticity Related Gene 1 (PRG1) genannt wurde [102]. Anschließende Analysen *in silico* führten zur Entdeckung vier weiterer Plasticity Related Genes: PRG2, PRG3, PRG4 und PRG5 [64, 80, 103]. PRGs sind integrale Membranproteine, die Sequenzhomologien zu Lipid Phosphat Phosphatasen aufweisen (Abbildung 1.7) und somit in die Familie der LPTs eingeordnet werden können. Aufgrund dieser Homologie werden sie auch Lipid Phosphatase-related protein (LPR) genannt [79, 104]. PRGs werden ausschließlich in Vertebraten exprimiert [64].

PRG1-Knockoutmäuse leiden an epileptischen Anfällen. Es wird angenommen, dass PRG1 bei der Regulation der hippocampalen Erregbarkeit eine wichtige Rolle spielt, indem es die

Aufnahme von Phospholipiden in Neurone fördert und somit einer Übererregbarkeit der Neuronen durch LPA vorbeugt [105].

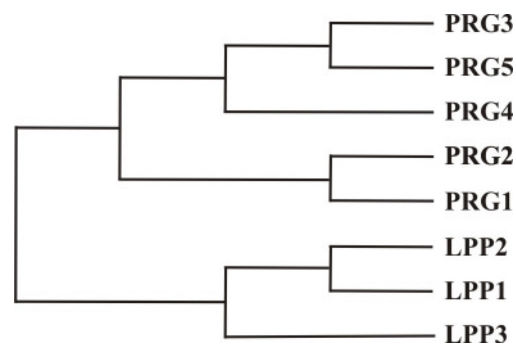


Abbildung 1.7: Phylogenetische Analyse von LPPs und PRGs. Darstellung der Verwandtschaft zwischen den einzelnen LPPs und PRGs [64].

Außer für PRG1 existieren auch für PRG3 (auch bekannt als Lipid Phosphatase-related protein 1, LPR1) Hinweise darauf, dass es eine Rolle während der ZNS-Entwicklung spielt [103, 106]. Experimente *in vitro* haben gezeigt, dass eine PRG3-Überexpression in verschiedenen neuronalen und nicht-neuronalen Zelllinien zu einer starken Ausbildung Aktinreicher, dynamischer Filopodien auf der gesamten Zelloberfläche bzw. einer Verlängerung der Neuriten führt [103, 107]. Diese PRG3-induzierte Filopodienausbildung war unabhängig von den dafür bekannten Signalkaskaden wie *cdc42*, *Rif* oder *Arp2/3*. Es wird vermutet, dass PRG3 die Ausbildung von Filopodien über einen neuen, bisher unbekanntem Signalweg induziert [107].

Im Gegensatz zu den LPPs konnte für PRG3 keine LPA-Phosphataseaktivität nachgewiesen werden. Dies kann auf Unterschiede in der potenziellen katalytischen Domäne zwischen LPPs und PRG3 zurückzuführen sein [107]. PRG3 weist darüber hinaus ebenfalls keine Phosphataseaktivität gegenüber anderen Phospholipiden wie Phosphatidat (PA), Sphingosin-1-phosphat (S1P) und Ceramid-1-phosphat (C1P) auf [103, 107]. Auch nach Mutagenese der nicht konservierten Aminosäuren in der putativen katalytischen Domäne von PRG3 zu der in LPPs vorkommenden Aminosäuresequenz konnte keine enzymatische Aktivität von PRG3 festgestellt werden [107].

Expressionsanalysen auf mRNA-Ebene ergaben, dass die meisten *PRG3*-Transkripte im Gehirn vorkommen. Anders als *PRG1*, dessen Expression im Northern Blot ausschließlich in Gehirn und Hoden nachgewiesen werden konnte, werden *PRG3*-Transkripte, wenn auch in wesentlich geringeren Mengen, neben Gehirn und Hoden in Leber und Niere exprimiert [103, 107]. Auf Proteinebene wurde die *PRG3*-Expression in allen untersuchten Geweben

nachgewiesen, wobei die stärkste Expression nicht im Gehirn, sondern in Niere, Lunge und Milz auftrat [107]. Während der Entwicklung konnten *PRG3*-Transkripte schon in embryonalen Stadien nachgewiesen werden [103, 106]. *PRG3* wird dabei stärker im dorsalen als im lateralen Kortex exprimiert [106]. In adulten Mäusen beschränkt sich die Expression von *PRG3* weitgehend auf den Hippocampus [103]. In den meisten hier genannten Studien wurde die *PRG3*-Expression ausschließlich auf mRNA-Ebene untersucht. Über die Expression von *PRG3*-Protein ist bisher noch wenig bekannt.

2 Ziel der Arbeit

In den letzten Jahren gab es zunehmend Hinweise darauf, dass bioaktive Phospholipide wie LPA eine wichtige Rolle während der Gehirnentwicklung spielen [16, 56-58]. LPA hat einen Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen. Es wird vermutet, dass LPA von postmitotischen Neuronen in der kortikalen Platte sezerniert wird und die Migration junger postmitotischer Neurone beeinflusst [56]. Diese Hinweise legen nahe, dass auch Proteine der LPT-Familie, die den Phospholipidstoffwechsel regulieren, eine entscheidende Rolle während der Gehirnentwicklung spielen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, Erkenntnisse über die Rolle von Proteinen der LPT-Familie während der Gehirnentwicklung zu gewinnen. Dies sollte am Beispiel von PRG3 bzw. LPP1 und -1a erfolgen.

PRG3

PRGs wurden vor wenigen Jahren im Rahmen einer Untersuchung zur Entdeckung neuer Proteine identifiziert, die an Regenerationsprozessen im ZNS beteiligt sind [102, 103]. Es gibt Hinweise darauf, dass PRG3 eine Rolle als auswachsassoziertes Molekül in neuronalen und nicht-neuronalen Zelllinien spielt [103, 107]. Die Expression und Funktion von PRG3 ist bisher nur sehr wenig untersucht und bisherige Untersuchungen kommen darüber hinaus zu unterschiedlichen Ergebnissen. Zur genaueren Analyse von PRG3 wurden in dieser Arbeit folgende Teilziele definiert:

- *Aufreinigung und Spezifitätstest polyklonaler Antikörper gegen PRG3.* Polyklonale Kaninchenantikörper sollen mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt und im Immunblot auf ihre Spezifität getestet werden.
- *Aufklärung der Glykosylierung von PRG3.* Dabei werden sowohl enzymatische als auch Mutationsanalysen an endogenem und rekombinantem PRG3-Protein zur Aufklärung einer möglichen N- und O-Glykosylierung durchgeführt. Anschließend soll die funktionelle Bedeutung einer potenziellen Glykosylierung von PRG3 *in vitro* untersucht werden.
- *Untersuchung der endogenen PRG3-Expression.* Hier soll die PRG3-Expression auf mRNA- und auf Proteinebene in unterschiedlichen Geweben und Zellen untersucht werden. Weiterhin soll die Expression von PRG3 während der Entwicklung analysiert werden.

- *Analyse der intrazellulären Lokalisation von PRG3 in Neuronen.* Die intrazelluläre Lokalisation von endogenem PRG3 soll immunzytochemisch in primären Neuronen nach unterschiedlich langer Kulturdauer analysiert werden, um daraus u.U. Rückschlüsse auf mögliche Funktionen von endogenem PRG3 ziehen zu können.

LPP1 und -1a

LPP1 und -1a wurden bisher nur im Hinblick auf ihre enzymatischen Eigenschaften ausführlich untersucht [79, 80]. Die Expression und Funktion im ZNS sind aber noch weitgehend unbekannt. Deshalb wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit folgende Teilziele definiert:

- *Aufreinigung und Spezifitätstest polyklonaler Antikörper gegen LPP1 und/oder -1a.* Dazu werden polyklonale Antikörper affinitätsgereinigt und im Immunblot auf ihre Spezifität getestet.
- *Auswirkungen der LPP1- und -1a-Expression auf die Morphologie von Neuroblastomzellen.* Für diese Experimente sollen LPP1- und -1a-Expressionsplasmide sowie entsprechende shRNA-Plasmide kloniert werden. Anschließend sollen die Auswirkungen einer Überexpression bzw. eines Knockdowns von LPP1 oder -1a auf die Morphologie von N1E-115-Neuroblastomzellen untersucht werden.
- *Untersuchung der endogenen Expression von LPP1 und -1a.* Hierzu soll die Expression von LPP1 und -1a mittels quantitativer Real-time RT-PCR in unterschiedlichen Geweben, Zellpopulationen und zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien analysiert werden. Weiterhin soll die Expression der LPP1- und -1a-Proteine im embryonalen Kortex immunhistochemisch untersucht werden.
- *Analyse der Funktion von LPP1 und -1a während der Kortextentwicklung.* Der Einfluss eines LPP1- und -1a-Knockdowns auf die radiale Kortextmigration soll anhand von Elektroporationsversuchen *in utero* untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Zubehör

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Fluka, Merck, Peqlab, Serva, Sigma, und Roth bezogen.

Plastikwaren und Zellkulturmaterialien wurden von den Firmen Applied Biosystems, BD Biosciences, Corning, Eppendorf, Nunc und Sarstedt bezogen.

Zellkulturmedien und Zusätze wurden von den Firmen Gibco, Sigma und Pan verwendet.

3.1.2 Reagenzien und Enzyme

Reagenz/Enzym	Hersteller
Benzyl-Gal-NAC	Sigma
Complete Proteaseinhibitor	Roche
DNase	Roche
dNTP Mix	Bioline
ECL Western Blotting Detection Reagenz	GE Healthcare
Endoglykosidase H	Roche
Effectene Transfection Reagent	Qiagen
FuGene6 Transfection Reagent	Roche
GoTaq-Polymerase	Promega
Herculase Hotstart DNA Polymerase	Stratagene
Hoechst	Sigma
Immu-Mount	Thermo Scientific
Peptid N-Glykosidase F	Roche
Restriktionsenzyme	New England BioLabs
Rhodamin-Phalloidin	Tebu-Bio
Shrimp alkalische Phosphatase	Promega
T4 DNA Ligase	New England BioLabs
T4 Polynukleotid Kinase	New England BioLabs
TaqMan 2x Universal PCR Master Mix No AmpErase UNG	Applied Biosystems
TRIzol	Invitrogen
Tunicamycin	Sigma

3.1.3 Kits

Kit	Hersteller
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen
BCA Protein Assay Kit	Thermo
HiTrap NHS-activated HP	GE Healthcare
Nucleospin Extract II	Machery-Nagel
NucleoBond PC 500	Machery-Nagel
μ MACS HA/GFP Tagged Protein Isolation Kit	Miltenyi Biotec
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen

Kit

Invisorb Spin Tissue Mini Kit
 QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit
 High Capacity cDNA reverse Transcription Kit

Hersteller

Invitex
 Stratagene
 Applied Biosystems

3.1.4 Geräte**Gerät**

Biomate 3 Spektrometer
 Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader
 Konfokales Laser Scanning Mikroskop TCS SL
 Fluoreszenzmikroskop BX50
 Fluoreszenzmikroskop IX81
 Zoom Stereomikroskop S6E L2
 ABI PRISM TM7500 Sequence Detection System
 Thermocycler PTC-100
 Zentrifugen: 5415R, 5804R
 Universal Zentifuge
 Elektrophorese-System Mini-Protean II
 PerfectBlue Semi-Dry Elektrobloetter
 Power pac 200
 HERAcell CO₂ Inkubator
 US Autoflow Automatic CO₂ Inkubator
 EasyCast Mini Gel Model B1A und B2
 Geldokumentationsanlage
 Dounce Homogenisator, Sonoplus GM70
 ULTRA TURRAX T25 basic
 Microm HM 650 V

Hersteller

Thermo Scientific
 BioTek
 Leica
 Olympus
 Olympus
 Leica
 Applied Biosystems
 MJ Research
 Eppendorf
 Hettich
 BioRad
 Peqlab
 BioRad
 Heraeus
 NuAire
 Owl Separation Systems
 Intas UV-Systeme
 Bandelin Elektronik
 IKA-Werke
 Thermo Scientific

3.1.5 Software**Software**

MetaMorph Systems 6.2r4
 Leica Confocal Software v. 2.61
 Adobe Photoshop 6.0

 CorelDRAW 10
 DNASIS MAX

 SPSS Statistics 17.0
 TaqMan 7500 Fast System Software
 Jack Lin's siRNA sequence finder
 NetNGlyc 1.0 Server
 ExPASy Compute pI/MW tool
 BLAST

Hersteller/Website

Universal Imaging, Downingtown, PA
 Leica
 Adobe Systems Incorporated, San Jose,
 Kalifornien, USA
 Corel Corporation, Ottawa, Kanada
 Hitachi Software Engineering, South San
 Francisco, CA
 SPSS, Chicago, Illinois
 Applied Biosystems
<http://www.ic.sunysb.edu/stu/shilin/rnai.html>
<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>
http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

3.1.6 Oligonukleotide

Oligonukleotide für die Klonierung oder Punktmutation von Expressionsplasmiden, zur Sequenzierung, zur Genotypisierung oder zur cDNA-Qualitätskontrolle, wurden von der Firma Metabion synthetisiert und sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. shRNA-Oligonukleotide zur Ligation in den pSuper-eGFP- oder pCGLH-Vektor wurden von der Firma Sigma-Genosys bezogen und sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Zusammenfassung der im Rahmen dieser Arbeit in der PCR eingesetzten Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung	NCBI-Nummer
mLPP1/1a for	5´-TGA CCA TGT TCG ACA AGA CG-3´	Klonierung von mLPP1 und -1a in pcR 2.1 TOPO	AY247795 AY247796
mLPP1/1a rev	5´-CTT CAG GGC TCG TGA TTG G-3´	Klonierung von mLPP1 und -1a in pcR 2.1 TOPO	AY247795 AY247796
mLPP1/1a BglII for	5´-AGA TCT ATG TTC GAC AAG ACG-3´	Klonierung von mLPP1 und -1a in peGFP-C1	AY247795 AY247796
mLPP1/1a Sall rev	5´-GTC GAC TGT CAG GGC TCG TGA TTG GTT-3´	Klonierung von mLPP1 und -1a in peGFP-C1	AY247795 AY247796
mLPP1/1a Sall for	5´-CTG TCG ACT ATG TTC GAC AAG ACG-3´	Klonierung von mLPP1 und -1a in pMT2-HA	AY247795 AY247796
mLPP1/1a XbaI rev	5´-GTT CTA GAT CAG GGC TCG TGA TTG GTT-3´	Klonierung von mLPP1 und -1a in pMT2-HA	AY247795 AY247796
mPRG3 XhoI for	5´-CTC GAG ATG GCT GTA GAA AAC AAC AC-3´	Klonierung von mPRG3 in peGFP-N1	AY345342
mPRG3 KpnI rev	5´-GGT ACC CAG GTG ACT TCG GTC ATG-3´	Klonierung von mPRG3 in peGFP-N1	AY345342
rPRG3 Sall for	5´-GTC GAC TAT GGC TGT AGA GAA CAA C-3´	Klonierung von rPRG3 in pMT2-HA	AY299399
rPRG3 EcoRI rev	5´-GAA TTC TCA GGT GAC TTC GGT CAT-3´	Klonierung von rPRG3 in pMT2-HA	AY299399
30 mer β Aktin 5´	5´-CAC CAC AGC TGA GAG GGA AAT CGT GCG TGA-3´	cDNA Qualitätskontrolle	NM_007393
30 mer β Aktin 3´	5´-ATT TGC GGT GCA CGA TGG AGG GGC CGG ACT-3´	cDNA Qualitätskontrolle	NM_007393
rPRG3 Sequ for	5´-ATG GCT GTA GAG AAC AAC AC-3´	Sequenzierungsprimer	AY299399
rPRG3 510 rev	5´-TGT TGA TGA ACT GGT GGT GTG C-3´	Sequenzierungsprimer	AY299399
mLPP1/1a Sequ for	5´-TCA TTC TCT ATG TAC TGC ATG CTG-3´	Sequenzierungsprimer	AY247795 AY247796
mLPP1/1a Sequ rev	5´-ATC CTG GCT TGA AGA TAA AGT G-3´	Sequenzierungsprimer	AY247795 AY247796
N-CMV-30 for	5´-AAT GTC GTA ATA ACC CCG CCC CGT TGA CGC-3´	Sequenzierungsprimer	AF239251
C-CMV-24 rev	5´-TAT TAG GAC AAG GCT GGT GGG CAC-3´	Sequenzierungsprimer	AF239251
rPRG3 N163 Q for	5´-TCG ACA GTG TGC CAG CCA CAA TAT ACC AGT ACA GAC TGC-3´	Punktmutation von p3xFLAG-rPRG3	AY299399
rPRG3 N163 Q rev	5´-GCA GTC TGT ACT GGT ATA TTG TGG CTG GCA CAC TGT CAG-3´	Punktmutation von p3xFLAG-rPRG3	AY299399

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung	NCBI-Nummer
LPP genot for	5'-TGC AGT GAT GGC TAT ATT GAG G-3'	Genotypisierung der LPP1-transgenen-Mäuse	AY247795
LPP genot rev	5'-AGC CAG AAG TCA GAT GCT CAA-3'	Genotypisierung der LPP1-transgenen-Mäuse	V00878

Tabelle 3.2: Zusammenfassung aller shRNA-Oligonukleotide die zur Ligation in den pSuper- oder pCGLH-Vektor verwendet wurden. NCBI-Nummern: mLPP1: AY247795, mLPP1a: AY247796 und Leuchtkäfer-Luziferase: AB261988.

Bezeichnung	Sequenz
LPP1-shRNA 130 for ¹	5'-GAT CCC CTG ACT CCA TCA AGT ACC CTT TCA AGA GAA GGG TAC TTG ATG GAG TCA TTT TTG GAA A-3'
LPP1-shRNA 130 rev ¹	5'-AGC TTT TCC AAA AAT GAC TCC ATC AAG TAC CCT TCT CTT GAA AGG GTA CTT GAT GGA GTC AGG G-3'
LPP1-shRNA 160 for ¹	5'-GAT CCC CGA CAC CAT ACC TTA TGC CTT TCA AGA GAA GGC ATA AGG TAT GGT GTC TTT TTG GAA A-3'
LPP1-shRNA 160 rev ¹	5'-AGC TTT TCC AAA AAG ACA CCA TAC CTT ATG CCT TCT CTT GAA AGG CAT AAG GTA TGG TGT CGG G-3'
LPP1-shRNA 190 for ¹	5'-GAT CCC CTA GTC ATT CCA TTC TGT ATT TCA AGA GAA TAC AGA ATG GAA TGA CTA TTT TTG GAA A-3'
LPP1-shRNA 190 rev ¹	5'-AGC TTT TCC AAA AAT AGT ACT TCC ATT CTG TAT TCT CTT GAA ATA CAG AAT GGA ATG ACT AGG G-3'
LPP1a-shRNA 90 for ¹	5'-GAT CCC CTT GGG CAA AGT ATA TCC ATT TCA AGA GAA TGG ATA TAC TTT GCC CAA TTT TTG GAA A-3'
LPP1a-shRNA 90 rev ¹	5'-AGC TTT TCC AAA AAT TGG GCA AAG TAT ATC CAT TCT CTT GAA ATG GAT ATA CTT TGC CCA AGG G-3'
LPP1a-shRNA 110 for ¹	5'-GAT CCC CTA TCC ATT TCA GAG GGG CTT TCA AGA GAA GCC CCT CTG AAA TGG ATA TTT TTG GAA A-3'
LPP1a-shRNA 110 rev ¹	5'-AGC TTT TCC AAA AAT ATC CAT TTC AGA GGG GCT TCT CTT GAA AGC CCC TCT GAA ATG GAT AGG G-3'
LPP1a-shRNA 150 for ¹	5'-GAT CCC CAG TAC CCG TAC CAT GAC AGT TCA AGA GAC TGT CAT GGT ACG GGT ACT TTT TTG GAA A-3'
LPP1a-shRNA 150 rev ¹	5'-AGC TTT TCC AAA AAA GTA CCC GTA CCA TGA CAG TCT CTT GAA CTG TCA TGG TAC GGG TAC TGG G-3'
LPP1/1a-shRNA 230 for ¹	5'-GAT CCC CGA ATC TCT GTC TGT TTA CTT TCA AGA GAA GTA AAC AGA CAG AGA TTC TTT TTG GAA A-3'
LPP1/1a-shRNA 230 rev	5'-AGC TTT TCC AAA AAG AAT CTC TGT CTG TTT ACT TCT CTT GAA AGT AAA CAG ACA GAG ATT CGG G-3'
LPP1/1a-shRNA 280 for ¹	5'-GAT CCC CTT CCT TTG TCG GCA ATC CCT TCA AGA GAG GGA TTG CCG ACA AAG GAA TTT TTG GAA A-3'
LPP1/1a-shRNA 280 rev ¹	5'-AGC TTT TCC AAA AAT TCC TTT GTC GGC AAT CCC TCT CTT GAA GGG ATT GCC GAC AAA GGA AGG G-3'
LPP1/1a shRNA 430 for ¹	5'-GAT CCC CTC AAC TGC AGT GAT GGC TAT TCA AGA GAT AGC CAT CAC TGC AGT TGA TTT TTG GAA A-3'
LPP1/1a-shRNA 430 rev ¹	5'-AGC TTT TCC AAA AAT CAA CTG CAG TGA TGG CTA TCT CTT GAA TAG CCA TCA CTG CAG TTG AGG G-3'
LPP1/1a-shRNA 710 for ¹	5'-GAT CCC CGC TGC TAT GGC TAT ACT GGT TCA AGA GAC CAG TAT AGC CAT AGC AGC TTT TTG GAA A-3'
LPP1/1a-shRNA 710 rev ¹	5'-AGC TTT TCC AAA AAG CTG CTA TGG CTA TAC TGG TCT CTT GAA CCA GTA TAG CCA TAG CAG CGG G-3'
Luziferase-shRNA for ¹	5'-GAT CCC CCG TAC GCG GAA TAC TTC GAT TCA AGA GAT CGA AGT ATT CCG CGT ACG TTT TTG GAA A-3'
Luziferase-shRNA rev ¹	5'-AGC TTT TCC AAA AAC GTA CGC GGA ATA CTT CGA TCT CTT GAA TCG AAG TAT TCC GCG TAC GGG G-3'

Bezeichnung	Sequenz
LPP1/1a-shRNA 230 for ²	5´-GAT CTC GGA ATC TCT GTC TGT TTA CTT TCA AGA GAA GTA AAC AGA CAG AGA TTC TTT TTT GGA AC-3´
LPP1/1a-shRNA 230 rev ²	5´-TCG AGT TCC AAA AAA GAA TCT CTG TCT GTT TAC TTC TCT TGA AAG TAA ACA GAC AGA GAT TCC GA-3´
Luziferase-shRNA for ²	5´-GAT CTC GCG TAC GCG GAA TAC TTC GAT TCA AGA GAT CGA AGT ATT CCG CGT ACG TTT TTT GGA AC-3´
Luziferase-shRNA rev ²	5´-TCG AGT TCC AAA AAA CGT ACG CGG AAT ACT TCG ATC TCT TGA ATC GAA GTA TTC CGC GTA CGC GA-3´

¹ zur Klonierung in den pSuper-Vektor, ² zur Klonierung in den pCGLH-Vektor.

Für die quantitative Real-time RT-PCR wurden, falls vorhanden, Primer und Sonden als TaqMan Gene Expression Assays von der Firma Applied Biosystems bezogen (Tabelle 3.3). Da für LPP1a kein geeigneter Assay zur Verfügung stand, wurden von der Firma Applied Biosystems entsprechende Primer und Sonden für LPP1a als Custom TaqMan Gene Expression Assays entworfen. Primer und Sonde für Maus HPRT wurden von der Firma Metabion synthetisiert (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.3: Zusammenfassung der eingesetzten TaqMan Gene Expression Assays für die quantitative Real-time RT-PCR.

Assay Bezeichnung	TaqMan Gene Expression Assay Nummer
PRG3	Mm00626670_m1
LPP1	Mm01297263_m1
Tuj1	Mm00727586_s1
Eif1a	Mm00456651_m1
GAPDH	4352932E
β-Aktin	4352933E

Tabelle 3.4: Zusammenfassung der in der quantitativen Real-time RT-PCR verwendeten Primer und Sonden.

Bezeichnung	Sequenz
LPP1a for	5´-GGC CCT CGA TGT GAT TTG C-3´
LPP1a rev	5´-GCC CCT CTG AAA TGG ATA TAC TTT GC-3´
LPP1a Sonde	5´-ATG GCA GCC AGC AAC A-3´
HPRT for	5´-ATC ATT ATG CCG AGG ATT TGG AA-3´
HPRT rev	5´-TTG AGC ACA CAG AGG GCC A-3´
HPRT Sonde	5´-TGG ACA GGA CTG AAA GAC TTG CTC GAG ATG-3´

3.1.7 Plasmide

In Tabelle 3.5 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten leeren Klonierungsvektoren aufgeführt.

Tabelle 3.5: Zusammenfassung der verwendeten Klonierungsvektoren.

Klonierungsvektor	Quelle
peGFP-N1	Clontech
peGFP-C1	Clontech
pMT2-HA	The Netherlands Cancer Institute
p3xFLAG-CMV-7.1	Sigma
pCR 2.1 TOPO	Invitrogen
pSuper-eGFP	Oligoengine
pCGLH	Yale University, New Haven, USA [108]

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Überexpressions- bzw. shRNA-Plasmide sind in Tabelle 3.6 bzw. Tabelle 3.7 aufgeführt.

Tabelle 3.6: Zusammenfassung der eingesetzten Überexpressionsplasmide.

Plasmid-Bezeichnung	Bezeichnung kodiertes Protein	Quelle
peGFP-C1-mLPP1	GFP-mLPP1	Eigene Arbeit
peGFP-C1-mLPP1a	GFP-mLPP1a	Eigene Arbeit
pMT2-HA-mLPP1	HA-mLPP1	Eigene Arbeit
pMT2-HA-mLPP1a	HA-mLPP1a	Eigene Arbeit
peGFP-C1-rPRG3	GFP-rPRG3	Laborsammlung
peGFP-N1-mPRG3	GFP-mPRG3	Eigene Arbeit
pMT2-HA-rPRG3	HA-rPRG3	Eigene Arbeit
p3xFLAG-CMV7.1-rPRG3	3xFLAG-rPRG3	Laborsammlung
p3xFLAG-CMV7.1-rPRG3 N163Q	3xFLAG-rPRG3 N163Q	Eigene Arbeit

Tabelle 3.7: Zusammenfassung der verwendeten shRNA-Plasmide. Alle shRNA-Plasmide wurden im Rahmen dieser Arbeit kloniert.

Plasmid-Bezeichnung	Bezeichnung kodierte shRNA
pSuper-RNAi-LPP1 130	LPP1-shRNA 130
pSuper-RNAi-LPP1 160	LPP1-shRNA 160
pSuper-RNAi-LPP1 190	LPP1-shRNA (190)
pSuper-RNAi-LPP1a 90	LPP1a-shRNA (90)
pSuper-RNAi-LPP1a 110	LPP1a-shRNA 110
pSuper-RNAi-LPP1a 150	LPP1a-shRNA 150
pSuper-RNAi-LPP1/1a 230	LPP1/1a-shRNA (230)
pSuper-RNAi-LPP1/1a 280	LPP1/1a-shRNA 280
pSuper-RNAi-LPP1/1a 430	LPP1/1a-shRNA 430
pSuper-RNAi-LPP1/1a 710	LPP1/1a-shRNA 710
pSuper-RNAi-Luziferase	Kontroll-shRNA
pCGLH-RNAi-LPP1/1a 230	LPP1/1a-shRNA
pCGLH-RNAi-Luziferase	Kontroll-shRNA

3.1.8 Peptide

Die als immunisierendes Antigen und zur Affinitätsreinigung verwendeten Peptide sind in Tabelle 3.8 aufgeführt und wurden von der Firma BioGenes synthetisiert.

Tabelle 3.8: Zusammenfassung der eingesetzten Peptide. Das N-terminale Cystein der PRG3-Peptide und das N-terminale Lysin der LPP-Peptide, wurde zur Verknüpfung des Peptids mit dem Carrier-Protein in die Peptidsequenz eingefügt.

Peptid-Bezeichnung	Peptid-Sequenz
PRG3 53	NH ₂ -CGDLMKPYPGTEEES-COOH
PRG3 296	NH ₂ -CGVPLMAFPRIESPLe-COOH
LPP1	NH ₂ -KNDDSIKYPYKEDTI-COOH
LPP1a	NH ₂ -KTDNSVKYPYHDSTI-COOH
LPP1/1a	NH ₂ -KDTHSYKERKEEDPH-COOH

3.1.9 Organismen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mikroorganismen und Zelllinien sind in Tabelle 3.9 aufgeführt.

Tabelle 3.9: Zusammenfassung der verwendeten Organismen.

Organismus	Bezugsquelle
Mikroorganismen	
<i>Escherichia coli</i> XL-1 blue	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> XL-10 gold	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> TOP10 One Shot	Invitrogen
Zelllinien	
N1E-115	ATCC
NSC-34	Institut de Neurobiologie de la Méditerranée, Marseille, Frankreich
HEK293	DMSZ
mESZ D3	Federal Institute for Risk Assessment, Berlin

3.1.10 Versuchstiere

Zur Präparation embryonalen Gewebes und primärer Neurone, sowie zur Elektroporation *in utero* wurden terminiert verpaarte C57BL/6-Mäuse aus der Zucht der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM, Berlin) bezogen. Die *in utero* Elektroporation wurde im Rahmen des Tierversuchsprojektes (Genehmigungsnummer: G007406 vom 30.06.2006) von einem Veterinärmediziner (Jan Baumgart) unter Einhaltung der Vorschriften durchgeführt. Postnatale und adulte C57BL/6 Mäuse zur Präparation von Geweben, Astrozyten oder Mikroglia (Mikroglia und Astrozyten wurden von Rike Dannenberg und Nora Ebermann präpariert) stammten ebenfalls von der FEM.

LPP1-transgene-FVBN-Mäuse [99] wurden vom der Arbeitsgruppe um Gabor Tigyi (Memphis, TN, USA) zur Verfügung gestellt und in der FEM gezüchtet.

3.1.11 Antikörper

Die eingesetzten Primär- bzw. Sekundärantikörper sind in Tabelle 3.10 bzw. Tabelle 3.11 aufgeführt.

Tabelle 3.10: Zusammenfassung aller eingesetzten Primärantikörper. IB: Immunblot; ICC: Immunzytochemie; IHC: Immunhistochemie.

Bezeichnung (Klon)	Hersteller	Wirtsorganismus	Klonalität	Verdünnung (Anwendung)
Anti- β -Aktin (AC-15)	Sigma	Maus	monoklonal	1:10000 (IB), 1:1000 (ICC)
Anti-BrdU (BU1/75(ICR1))	Sera Laboratories	Ratte	monoklonal	1:250 (IHC)
Anti-Brn2	Santa Cruz	Ziege	polyklonal	1:250 (IHC)
Anti-FLAG (M2)	Sigma	Maus	monoklonal	1:1000 (IB), 1:500 (ICC)
Anti-GFP	abcam	Kaninchen	polyklonal	1:2500 (ICC), 1:1500 (IHC)
Anti-GFP	abcam	Ziege	polyklonal	1:1000 (IHC)
Anti-GFP (JL-8)	Clontech	Maus	monoklonal	1:1000 (IB)
Anti-GFAP	Millipore	Maus	monoklonal	1:5000 (IB)
Anti-HA (3F10)	Roche	Ratte	monoklonal	1:1000 (IB)
Anti-Iba1	Wako	Kaninchen	polyklonal	1:2000 (IB)
Anti-LPP1	Eigene Herstellung	Kaninchen	polyklonal	1:500 (IB)
Anti-LPP1a	Eigene Herstellung	Kaninchen	polyklonal	1:500 (IB)
Anti-LPP1/1a	Eigene Herstellung	Kaninchen	polyklonal	1:500 (IB), 1:1000 (IHC)
Anti-MAP2 (HM-2)	Sigma	Maus	monoklonal	1:1000 (ICC), 1:1000 (IHC)
Anti-Nestin (Rat 401)	BD Pharmingen	Maus	monoklonal	1:250 (IHC)
Anti-Phospho-H3 (ser10)	Millipore	Kaninchen	polyklonal	1:300 (IHC)
Anti-PRG3 53	Eigene Herstellung	Kaninchen	polyklonal	1:500 (IB), 1:100 (ICC)
Anti-PRG3 296	Eigene Herstellung	Kaninchen	polyklonal	1:500 (IB), 1:200 (ICC)
Anti-PSD95 (7E3-1B8)	Alexis	Maus	monoklonal	1:200 (ICC)
Anti-Synaptobrevin2 (69.1)	Synaptic Systems	Maus	monoklonal	1:1000 (ICC)
Anti-Synaptophysin1 (7.2)	Synaptic Systems	Maus	monoklonal	1:1000 (ICC)
Anti-Tau1 (PC1C6)	Chemicon	Maus	monoklonal	1:200 (ICC)
Anti-Tbr1	Chemicon	Kaninchen	polyklonal	1:1000 (IHC)
Anti- α -Tubulin (DM 1A)	Sigma	Maus	monoklonal	1:1500 (ICC)
Anti-Tuj1	Covance	Maus	monoklonal	1:2500 (IB), 1:500 (IHC)
Anti-VGAT1	Synaptic Systems	Meerschweinchen	polyklonal	1:500 (ICC)
Anti-VGLUT1	Chemicon	Meerschweinchen	polyklonal	1:1000 (ICC)

Tabelle 3.11: Zusammenfassung aller eingesetzten Sekundärantikörper. IB: Immunblot; ICC: Immunzytochemie; IHC: Immunhistochemie.

Bezeichnung	Hersteller	Wirtsorganismus	Verdünnung (Anwendung)
Anti-mouse IgG Alexa Fluor 488	Invitrogen	Ziege	1:1500 (ICC)
Anti-rabbit IgG Alexa 488	Invitrogen	Ziege	1:1500 (ICC), 1:1000 (IHC)
Anti-rabbit IgG Alexa 488	Invitrogen	Esel	1:1000 (IHC)
Anti-goat IgG Alexa 488	Invitrogen	Esel	1:1000 (IHC)
Anti-rabbit IgG Cy3	Jackson ImmunoResearch	Esel	1:500 (IHC)
Anti-mouse IgG Alexa 568	Invitrogen	Ziege	1:1500 (ICC), 1:1000 (IHC)
Anti-goat IgG Alexa 568	Invitrogen	Esel	1:500 (IHC)
Anti-rat IgG Alexa 568	Invitrogen	Ziege	1:1000 (IHC)
Anti-guinea pig IgG Cyt3	Jackson ImmunoResearch	Ziege	1:1000 (ICC)
Anti-rabbit IgG HRP-linked	GE Healthcare	Esel	1:5000 (IB)
Anti-mouse IgG HRP-linked	GE Healthcare	Schaf	1:5000 (IB)
Anti-rat IgG HRP-linked	GE Healthcare	Ziege	1:5000 (IB)

3.1.12 Medien, Puffer und Lösungen

In Tabelle 3.12 sind die verwendeten Puffer und deren Zusammensetzung aufgeführt.

Tabelle 3.12: Zusammenfassung der verwendeten Puffer

Name	Zusammensetzung
<i>Zellkultur</i>	
N1E-115-Medium	DMEM (+ 4,5 g/L Glukose, + L-Glutamin, + Pyruvat), 10 % (v/v) Fötale Kälberserum (FKS), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
HEK293-Medium	DMEM (+ 4,5 g/L Glukose, + L-Glutamin, - Pyruvat, + 3,7 g/L NaHCO ₃), 10 % (v/v) FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin
NSC-34-Medium	DMEM (+ GlutaMAX I, + 4,5 g/L Glukose, + 25 mM HEPES, - Pyruvat), 10 % (v/v) FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
Plating-Medium	MEM (mit Earle's Salzen), 0,6 % (w/v) Glukose, 10 % (v/v) Pferdeserum, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
Wachstumsmedium	Neurobasal Medium, B27 (50 x Stock), 0,5 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
2 x Einfriermedium	80 % (v/v) FKS, 20 % (v/v) DMSO
2 x HeBS-Puffer	10 g/L HEPES, 0,74 g/L KCl, 0,25 g/L Na ₂ HPO ₄ (pH 7,1)
<i>Bakterielle Medien</i>	
DYT-Medium	5 g/L NaCl, 16 g/L Trypton, 10 g/L Hefeextrakt, (pH 7,0 mit 1 M NaOH)
DYT-Agarplatten	10 g/L NaCl, 10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 20 g/L Agar
LB-Medium mit Glycerin	5 g/L NaCl, 5 g/L Trypton, 2,5 g/L Hefeextrakt, 50 % (v/v) Glycerin
<i>Plasmidisolierung</i>	
Puffer E1	10 mM EDTA, 25 mM Tris (pH 8,0), 100 µg/ml RNase, 100 µg/ml Lysozym
Puffer E2	1 % (w/v) SDS, 200 mM NaOH
Puffer E3	2,8 M Kaliumacetat (pH 5,1)

Name	Zusammensetzung
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA (pH 8,0)
<i>shRNA-Ligation</i>	
Annealing Puffer	100 mM Kaliumacetat, 30 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 2 mM Magnesiumacetat
<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	
10 x TBE-Puffer	108 g/L Tris, 55 g/L Borsäure, 20 mM EDTA
10 x TBE Puffer mit Guanosin	2,832 g/L Guanosin in 10 x TBE Puffer
10 x DNA-Laufpuffer	500 g/L Saccharose, 2,5 g/L Bromphenolblau in 1 x TBE-Puffer
<i>Proteinextraktion</i>	
Lysepuffer I	150 mM NaCl, 1 % (v/v) NP-40, 25 mM MgCl ₂ , 10 % (v/v) Glycerin, 50 mM Tris (pH 7.4)
Lysepuffer II	5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 25 mM Saccharose, 20 mM Tris (pH 7.5)
10 x PBS	80 g/L NaCl, 2 g/L KCl, 14,5 g/L Na ₂ HPO ₄ , 2,4 g/L KH ₂ PO ₄ (pH 7,4)
<i>Deglykosylierung</i>	
PNGase F-Puffer	1,25 % (v/v) Triton-X-100, 18,8 µl Tris (pH 7,4)
EndoH-Puffer	1,25 % (v/v) Triton-X-100, 50 mM Natriumacetat (pH 5,5)
<i>SDS-PAGE und Western Blot</i>	
3 x Probenpuffer	7,6 g/L Tris, 100 g/L Saccharose, 100 g/L SDS, 0,5 g/L Bromphenolblau
10 x Elektrophoresepuffer	30,28 g/L Tris, 144,12 g/L Glycin, 10 g/L SDS
Trenngelpuffer	181,6 g/L Tris, 4 g/L SDS (pH 8,8)
Sammelgelpuffer	60,6 g/L Tris, 4 g/L SDS (pH 6,8)
Polyacrylamidtrenngel	4 ml Trenngelpuffer, 6,4 ml Acrylamid, 2,56 ml Bisacrylamid, 3,04 ml Aqua dest. 20 µl TEMED, 160 µl APS
Polyacrylamidsammelgel	1,5 ml Sammelgelpuffer, 0,75 ml Acrylamid, 0,3 ml Bisacrylamid, 3,45 ml Aqua dest. 7,8 µl TEMED, 60 µl APS
Blotpuffer	14,42 g/L Glycin, 3,03 g/L Tris, 20 % (v/v) Methanol
Ponceau-Rot	0,2 g/L Ponceau S, 3 g/L Trichloressigsäure
<i>Immunhistochemie</i>	
0,1 M Phosphatpuffer (PB)	13,97 g/L K ₂ HPO ₄ , 2,69 g/L KH ₂ PO ₄ (pH 7,4)
4 % Paraformaldehyd (PFA)	4 % (w/v) PFA in 0,1 M PB
4 % PFA mit 15 % Saccharose	4 % (w/v) PFA, 15 % (w/v) Saccharose in 1 x PBS
0,1 M Boratpuffer	6.18 g/L Borsäure (pH 8,5)
Blockierungslösung	10 % (v/v) FKS, 0,1 % (w/v) Glycin, 0,1 % (w/v) Lysin, 0,1 % (v/v) Triton-X-100

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Kultur und Passage von Zelllinien

Die Maus-Neuroblastomzellen N1E-115, Maus-Motorneuronenzellen NSC-34 und humane embryonale Nierenzellen HEK293 wurden in Zellkulturflaschen in N1E-115-, NSC-34- bzw. HEK293-Medium in einer 5 %-igen CO₂-Atmosphäre bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellen wurden 2 bis 3 Mal pro Woche passagiert und je nach Zelllinie 1:4 bis 1:20 ausgedünnt. Dazu wurden die Zellen nach mikroskopischer Begutachtung der Zellmorphologie abgeschabt und 5 min bei 135 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in frischem Medium resuspendiert und auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Die Abwesenheit von kontaminierenden Mykoplasmen wurde regelmäßig kontrolliert.

3.2.1.2 Kryokonservierung von Zelllinien

Zum Konservieren der Zellen wurden ca. 80 % konfluente Kulturen 5 min bei 135 g pelletiert. Das Pellet einer T175-Flasche wurde in 1,5 ml Medium resuspendiert und davon jeweils 0,5 ml in ein Einfrierröhrchen überführt und mit 0,5 ml 2 x Einfriermedium versetzt. Danach wurde die Zellsuspension mittels eines mit Isopropanol gefüllten Gefrierblocks auf –80 °C eingefroren und im Anschluss daran in flüssigem Stickstoff bei –196 °C gelagert.

Um die kryokonservierten Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden sie aufgetaut, mit frischem Zellkulturmedium gemischt, 5 min bei 135 g pelletiert, das Pellet in frischem Medium resuspendiert und in eine T75-Flasche überführt.

3.2.1.3 Präparation primärer Neurone

Für die Präparation primärer, hippocampaler und kortikaler Neurone wurden Mausembryonen im Embryonalstadium 18 (E18) verwendet. Dazu wurde die tragende Mutter getötet, anschließend der Bauchraum eröffnet und die Embryonen entnommen. Aus den Embryonen wurden die Gehirne isoliert, die Meningen sorgfältig abpräpariert, die Hippocampi und Kortizes herausgeschnitten und in eiskaltem HBSS gesammelt. Nach zweimaligem Waschen des Gewebes mit eiskaltem HBSS wurde das Gewebe in 4 ml HBSS resuspendiert und 100 bis 500 µl Trypsinlösung (je nach Größe des Zellpellets) zugegeben. Nach 15 min Inkubation bei 37 °C wurde die Verdauung abgenommen und der Verdau durch Zugabe von 3 ml Plating-Medium abgestoppt. Es wurden 2 µl DNaseI zugegeben und die Zellen mittels einer feuerpolierten Pasteurpipette trituriert. Nach dem Absetzen nicht verdauter Gewebeteile wurde der Zellüberstand in ein neues Gefäß überführt, resuspendiert und die Zellzahl mittels

Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden in einer Dichte von 15.000 bis 25.000 Zellen/cm² in 12 Loch-Platten auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen oder in entsprechend beschichteten Zellkulturschalen ausgesät. Nach ca. 3 h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann in Wachstumsmedium überführt. Die Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

3.2.1.4 Transiente Transfektion

FuGene6

N1E-115-Zellen wurden in einer Dichte von 5.000 Zellen/cm² in 12-Loch-Platten auf Deckgläschen ausplattiert und einen Tag später mit FuGene6 transfiziert. Dazu wurden jeweils pro Ansatz 50 µl serumfreies OPTIMEM mit 3 µl FuGene6 gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 0,5 µg DNA zugegeben und erneut für 15 min bei RT inkubiert. Das Gemisch wurde auf die Zellen gegeben. Achtundvierzig Stunden nach Transfektion wurde das Kulturmedium gegen serumfreies OPTIMEM ausgetauscht und die Zellen 6 h später fixiert.

Effectene

Primäre, hippocampale Neurone wurden wenige Stunden nach dem Ausplattieren in einer Dichte von 20.000 Zellen/cm² in 12-Loch-Platten mit Effectene transfiziert. Pro Ansatz wurden 75 µl EC-Puffer mit 1 µg Plasmid-DNA und 5 µl Enhancer gemischt. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurden 8 µl Effectene dazugegeben, erneut gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Wachstumsmedium wurde der Reaktionsansatz gleichmäßig auf den Zellen verteilt. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für 2 Tage bis zur Fixierung in Wachstumsmedium inkubiert.

Kalziumphosphat-Präzipitation

HEK293-Zellen wurden in einer Dichte von 20.000 Zellen/cm² in 6- oder 12-Loch-Platten bzw. in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 9 cm ausplattiert und einen Tag später mittels Kalziumphosphat-Präzipitation transfiziert. Der Transfektionsansatz für ein Loch einer 6-Loch-Platte bzw. zwei Löcher einer 12-Loch-Platte setzte sich wie folgt zusammen: 3 µg DNA (bei Doppeltransfektionen 2 x 2 µg), 67,5 µl steriles H₂O, 7,5 µl 2 M Kalziumchlorid und 67,5 µl 2 x HeBS Puffer. Der Ansatz wurde gemischt, für 15 bis 30 min bei RT inkubiert und zu den Zellen gegeben. Für die Transfektion von Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 9 cm wurde ein Transfektionsansatz mit 22 µg DNA, 341 µl H₂O, 37,5 µl Calciumchlorid und 341 µl 2 x HeBS Puffer angesetzt. Nach ein bis zwei Tagen wurden die

Zellen fixiert und immunchemisch gefärbt. Zur Herstellung von Totalproteinlysate oder rekombinantem Protein wurden die Zellen ein bis zwei Tage nach Transfektion lysiert.

3.2.1.5 Inhibition von N- und O-Glykosylierungen

N-Glykosylierung

HEK293-Zellen wurden in einer Dichte von 20.000 Zellen/cm² in 6-Loch-Platten ausplattiert. Vierundzwanzig Stunden später wurde Tunicamycin in DMSO in einer Endkonzentration von 5 µg/ml zu den Zellen gegeben. Drei Stunden danach wurden die HEK293-Zellen mit 3xFLAG-rPRG3 transfiziert und weitere 24 h bis zur Zellyse mit 5 µg/ml Tunicamycin kultiviert. Zur Kontrolle wurden die Zellen nur mit DMSO behandelt.

O-Glykosylierung

HEK293-Zellen wurden in einer Dichte von 20.000 Zellen/cm² in 6-Loch-Platten ausplattiert. Vierundzwanzig Stunden später wurde Benzyl-2-acetamido-2-desoxy- α -D-galacto-pyranosid (Benzyl GalNAc) in DMSO in einer Endkonzentration von 2,4 mM zu den Zellen gegeben. Nach 4-stündiger Inkubation wurden die Zellen mit 3xFLAG-rPRG3 transfiziert und weitere 24 h bis zur Zellyse mit 2,4 mM Benzyl GalNAc kultiviert. Die Behandlung mit DMSO alleine diente als Kontrolle.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 RNA-Extraktion

Für die RNA-Isolierung wurden unterschiedliche Gewebe aus Maus- und Rattenembryonen sowie postnatalen Tieren entnommen, in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend in TRIzol-Reagenz mittels ULTRA TURRAX T25 basic homogenisiert. Primäre Zellen und Zelllinien wurden in PBS pelletiert und das Pellet in TRIzol-Reagenz resuspendiert. Total-RNA aus Geweben oder Zellen wurde mittels TRIzol-Reagenz nach Herstellerangaben isoliert. Die RNA wurde in RNase-freiem Aqua bidest. aufgenommen und die RNA-Konzentration mittels Biomate 3 Spektrometer durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm bestimmt. Zur Untersuchung der Reinheit der RNA wurde zusätzlich die optische Dichte bei 280 nm gemessen. Der Quotient OD260/OD280 sollte hierbei zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

3.2.2.2 Reverse Transkription (RT)

Die cDNA-Synthese wurde mittels High Capacity cDNA reverse Transcription Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Kontrolle wurde jeweils ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase (noRT) mitgeführt. Die cDNA wurde anschließend mit Aqua bidest. im

Verhältnis 1:5 verdünnt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die erfolgreiche Umschreibung wurde mittels konventioneller PCR-Reaktion mit einem Primerpaar für β -Aktin kontrolliert. Da keine DNase-Behandlung der RNA vorgenommen wurde, wurden für den Nachweis der Abwesenheit von genomischer DNA die noRT-Proben auf Abwesenheit eines PCR-Produkts in der β -Aktin-Kontroll-PCR (Primer siehe Tabelle 3.1) getestet.

3.2.2.3 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Zur Klonierung von PRG3 und LPP1 bzw. -1a aus Plasmid- oder cDNA wurden die PCRs mittels Herculase, einer Proofreading-DNA-Polymerase, durchgeführt. Für die Genotypisierung transgener Mäuse und die PCR zur cDNA-Qualitätskontrolle wurde die GoTaq-Polymerase ohne Proofreadingaktivität eingesetzt. Mittels PCR können definierte DNA-Sequenzen amplifiziert werden. Die Amplifikation verläuft in drei Schritten: DNA-Hitze-Denaturierung, Primer-Anlagerung (Annealing) und der DNA-Synthese (Elongation). Die PCR-Reaktion wurde je nach verwendeter DNA-Polymerase unterschiedlich, wie in Tabelle 3.13 zusammengefasst, angesetzt. PCR-Primer sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tabelle 3.13: Zusammenfassung der PCR-Ansätze mit Herculase oder GoTaq-Polymerase.

Substanz	Herculase-Ansatz	GoTaq-Polymerase-Ansatz
Template DNA	10 ng – 100 ng	1 μl
10xHerculase Puffer bzw. 5xGoTaq Puffer	2,5 μl	5 μl
dNTPs (je 2,5 mM)	1 μl	1 μl
5'-Primer (10 μM)	1 μl	1 μl
3'-Primer (10 μM)	1 μl	1 μl
Taq-Polymerase	0,5 μl	0,2 μl
H ₂ O	ad 25 μl	ad 25 μl

Die verwendeten PCR-Programme sind in Tabelle 3.14 dargestellt.

Tabelle 3.14: Auflistung der verwendeten PCR-Programme: Programm 1: Klonierung, Programm 2: Genotypisierung und cDNA-Qualitätskontrolle.

Schritt	Vorgang	Programm 1	Programm 2:
1	Initiale Denaturierung	95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min	95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min
2	Denaturierung	94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s	94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s
3	Annealing	43 - 48 $^{\circ}\text{C}$ 30 s*	52 - 70 $^{\circ}\text{C}$ 30 s*
4	Elongation	72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min	72 $^{\circ}\text{C}$ 30 - 60 s**
6	Zyklen	10	30
7	Denaturierung	94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s	-
8	Annealing	53 - 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s*	-
9	Elongation	72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min	-
10	Zyklen	30	-
11	Finale Elongation	72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min	72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min

* Annealing-Temperatur wurde dem Schmelzpunkt der Primer angepasst

** Elongationszeit wurde der Länge des Amplifikats angepasst

3.2.2.4 Quantitative Real-time RT-PCR

Die quantitative Real-time RT-PCR wurde im 96-Loch-Format durchgeführt. Jede Reaktion beinhaltete: 8 µl H₂O, 10 µl TaqMan Universal PCR Master Mix, 1 µl 1:5 verdünnte cDNA und 1 µl TaqMan Gene Expression Assay (Kapitel 3.1.6). Für das Standardgen *HPRT* wurde kein TaqMan Gene Expression Assay verwendet. Der Reaktionsmix für *HPRT* sah deshalb wie folgt aus: 3,4 µl H₂O, 10 µl TaqMan Universal PCR Master Mix, 1 µl cDNA, 4,8 µl Primermix und 0,8 µl Sonde. Es wurden jeweils Zweifachbestimmungen durchgeführt. Das anschließende PCR-Programm im ABI PRISM TM7500 Sequence Detection System sah wie folgt aus: 2 min bei 50 °C und 10 min bei 95 °C gefolgt von 40 Zyklen a 15 s bei 95 °C und 1 min bei 60 °C. Für alle TaqMan Gene Expression Assays bzw. Primer/Sonden Paare, wurde zuerst die Amplifikationseffizienz mittels einer 1:10 oder 1:4 Verdünnungsreihe an cDNA aus einem geeigneten Gewebe bestimmt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Assays zeigten hierbei eine Effizienz von 90 – 100 %. Als Kontrolle wurden jeweils noRT-Proben mitgeführt, um sicher zu stellen, dass nicht fälschlicherweise in der Probe vorhandene genomische DNA detektiert wurde. Für alle Versuchsreihen wurde zu Beginn des Versuchs das bestmögliche Standardgen ausgewählt. Hierzu wurde eine quantitative Real-time RT-PCR mit *HPRT*, *GAPDH* und *β-Aktin* durchgeführt und das Gen als Standard ausgewählt, das innerhalb der Versuchsreihe möglichst gleichmäßig in allen Proben amplifiziert wurde, d.h. bei dem der C_T-Wert am wenigsten schwankte. Die C_T-Werte wurden jeweils in der Mitte der exponenziellen Phase ermittelt. Für jedes Experiment wurde der Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Experimenten bestimmt. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der TaqMan 7500 Fast System Software ausgewertet.

3.2.2.5 Gerichtete Mutagenese

Die Punktmutation von rPRG3 wurde mit Hilfe des QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kits nach Herstellerangaben durchgeführt. Komplementäre Oligonukleotide (Tabelle 3.1), welche die gewünschte Mutation enthielten, banden an die komplementären Stellen des zu mutierenden Inserts und wurden von der PfuTurbo DNA-Polymerase mittels PCR verlängert. Danach erfolgte ein DpnI-Verdau der methylierten und hemimethylierten nicht mutierten Ausgangs-DNA. Anschließend wurden *E. coli* ultrakompetente Zellen (Stamm XL-10 gold) mit der neu synthetisierten DNA transformiert. Die mutierten Plasmide wurden aus einzelnen Klonen aufgereinigt und zur Überprüfung der Plasmididentität sequenziert.

3.2.2.6 Plasmidisolierung

Zur Plasmidisolierung im kleinen Maßstab wurden auf Selektivmediumplatten gewachsene Klone in jeweils 5 ml DYT-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin bzw. 25 µg/ml Kanamycin für ca. 16 h bei 37 °C unter Schütteln vermehrt. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte mittels alkalischer Lyse [109]. Dazu wurden die Bakterien aus der Übernachtskultur mittels Zentrifugation pelletiert und in 200 µl Puffer E1 resuspendiert. Anschließend wurden die Bakterien durch Zugabe von 200 µl Puffer E2 lysiert, vorsichtig gemischt und 3 min bei RT inkubiert. Die Zellyse wurde durch Zugabe von 200 µl Puffer E3 gestoppt und gleichzeitig wurden sowohl genomische DNA als auch Proteine ausgefällt. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation für 20 min bei 14.000 g. Die Plasmid-DNA im Überstand wurde mit 900 µl Isopropanol präzipitiert und erneut für 20 min bei 14.000 g zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 1 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen, 5 min bei 14.000 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen, anschließend 10 min luftgetrocknet und in 30 µl Aqua bidest. gelöst. Außerdem wurde von jeder Übernachtskultur eine Glycerinkultur angelegt (1 ml Übernachtskultur und 1 ml LB-Medium mit Glycerin) und diese bei –80 °C gelagert.

Zur Plasmidisolierung im großen Maßstab wurde eine Übernachtskultur in 250 ml DYT-Medium (100 µg/ml Ampicillin bzw. 25 µg/ml Kanamycin) durch Überimpfen aus der entsprechenden Glycerinkultur angesetzt und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Aus der Übernachtskultur wurde eine Plasmidisolierung mit Hilfe des NucleoBond PC 500 Maxiprep Kit, entsprechend den Herstellerangaben, durchgeführt. Die DNA wurde je nach Pelletgröße in 100 – 400 µl TE-Puffer aufgenommen, die DNA-Konzentration bestimmt (Kapitel 3.2.2.8) und auf eine Konzentration von 1 µg/µl durch Verdünnung mit TE-Puffer eingestellt.

Für die *in utero* Elektroporationsversuche wurde die Plasmidisolierung unter endotoxinfreien Bedingungen mit Hilfe des EndoFree Plasmid Maxi Kits nach Herstellerangaben durchgeführt. Die DNA wurde in 50 µl TE-Puffer aufgenommen, die DNA-Konzentration bestimmt (Kapitel 3.2.2.8) und auf eine Konzentration von 4 µg/µl mit TE-Puffer eingestellt.

3.2.2.7 Restriktionsverdau

Zur Selektion positiver Klone aus der Plasmidisolierung und zur Kontrolle der Identität von Plasmid-DNA erfolgte ein Restriktionsverdau. Für diesen Restriktionsverdau wurde je 1 µl jedes Restriktionsenzym, im für die jeweilige Enzymkombination geeigneten 10 x Puffer, verwendet. Die Plasmid-DNA wurde in einem Reaktionsvolumen von 50 µl für 1 h bei 37 °C behandelt und anschließend 15 µl des Reaktionsansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen (Kapitel 3.2.2.9).

3.2.2.8 DNA-Konzentrationsbestimmung und -Sequenzierung

Die Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA erfolgte mittels Biomate 3 Spektrometer über die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Der Reinheitsgrad der DNA wurde über das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ sollte hierbei zwischen 1,6 und 1,8 liegen. Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde nach der Sanger-Methode bei der Firma Eurofins MWG Operon durchgeführt.

3.2.2.9 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden gemäß ihrer Größe in einem 1 %-igen Agarosegel in 1 x TBE-Puffer im elektrischen Feld aufgetrennt. Um die DNA im Gel sichtbar zu machen wurden 0,3 µg/ml Ethidiumbromid zum Gel gegeben. Als Elektrophorese-Puffer wurde ebenfalls 1 x TBE-Puffer verwendet. Die aufzutrennenden Proben wurden mit 10 x DNA-Laufpuffer versetzt und parallel zu einem Längenstandard aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 10 - 13 V/cm. Waren die Fragmente ausreichend aufgetrennt, wurde die Elektrophorese gestoppt und das Gel zur Dokumentation auf einen Transilluminator gelegt und fotografiert. Für präparative Gele wurde als Elektrophorese-Puffer und zur Herstellung des Gels 1 x TBE-Puffer mit Guanosin verwendet, um die DNA vor Schäden durch UV-Strahlung zu schützen.

3.2.2.10 Hitzetransformation chemisch kompetenter Bakterien

Chemokompetente *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut, vorsichtig mit 200 – 500 ng der zu transformierenden Plasmid-DNA gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 90 s bei 42 °C. Der Ansatz wurde erneut auf Eis gestellt und 250 µl DYT-Medium zugegeben. Danach wurde für 1 h bei 37 °C geschüttelt, der gesamte Ansatz zur Selektion positiver Klone auf DYT-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin bzw. 25 µg/ml Kanamycin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.2.11 Klonierung von Überexpressionsplasmiden

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Plasmide sind in Tabelle 3.6 dargestellt. Dazu wurden je 10 µg des jeweiligen Zielvektors über Nacht bei 37 °C mit den jeweiligen Restriktionsenzymen verdaut (Kapitel 3.2.2.7), anschließend in einem präparativen Agarosegel (Kapitel 3.2.2.9) aufgetrennt und mittels Nucleospin Extract II Kits nach Herstellerangaben aus dem Gel extrahiert. Die Dephosphorylierung von 1 µg linearisiertem

Vektor erfolgte mit 2 µl Shrimp alkalischer Phosphatase in einem Ansatz von 30 µl für 30 min bei 37 °C mit anschließender Inaktivierung bei 65 °C für 15 min. Die Inserts wurden mittels PCR (Kapitel 3.2.2.3) aus cDNA oder aus einem Expressionsplasmid als Template-DNA mit Hilfe der DNA-Polymerase Herculase hergestellt. Die Primer (Kapitel 3.1.6) enthielten am 5'-Ende die Erkennungssequenz für ein Restriktionsenzym zur gerichteten Klonierung in den jeweiligen Expressionsvektor. Die PCR-Ansätze wurden in einem präparativen Agarose-Gel aufgetrennt und das Produkt mit dem Nucleospin Extract II Kit aufgereinigt. Das aus dem Gel aufgereinigte PCR-Produkt wurde entsprechend der Anleitung des TOPO TA Cloning Kits in den pCR 2.1-TOPO-Vektor inseriert, mittels Hitze-transformation in chemokompetente *E. coli* TOP10 One Shot transformiert und auf DYT-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin bzw. 25 µg/ml Kanamycin ausgestrichen. Nach der Inkubation der transformierten *E. coli* über Nacht bei 37 °C wurden von einigen Kolonien Übernachtkulturen angesetzt. Aus diesen Übernachtkulturen wurden Plasmidisolierungen im kleinen Maßstab (Kapitel 3.2.2.6) mit anschließendem Restriktionsenzym-Kontrollverdau durchgeführt. Der anschließende Verdau von 10 µg Plasmid-DNA positiver Klone mit den jeweiligen zur Klonierung ausgewählten Restriktionsenzymen erfolgte über Nacht bei 37 °C. Nach erneuter Extraktion aus einem Agarosegel mittels Nucleospin Extract II Kit wurden die Inserts für die Ligation eingesetzt. Die Ligation wurde in einem Volumen von 10 µl angesetzt. Dieses beinhaltete unter anderem 1 µl 10 x T4 DNA-Ligasepuffer und 1 µl T4 DNA-Ligase. Dephosphorylierter Vektor und Insert wurden in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 16 °C. Anschließend wurde der Ansatz in *E. coli* XL-10 gold oder XL-1 blue transformiert und auf DYT-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin bzw. 25 µg/ml Kanamycin zur Selektion positiver Klone ausplattiert. Von einigen Kolonien wurde eine Plasmidisolierung im kleinen Maßstab durchgeführt. Nach anschließendem Kontrollverdau wurden einige dieser Klone sequenziert (Kapitel 3.2.2.8) und zur weiteren Verwendung im großen Maßstab präpariert (Kapitel 3.2.2.6).

3.2.2.12 Klonierung von shRNA-Plasmiden

Die Sequenzen für geeignete shRNA-Oligonukleotide wurden mit Hilfe der Software *Jack Lin's siRNA sequence finder* ermittelt. Die Oligonukleotide (Tabelle 3.2) zur Klonierung der shRNA-Plasmide wurden in Aqua bidest. in einer Konzentration von 1 pmol/µl gelöst. Zum Annealing der Oligonukleotide wurde jeweils 1 µl des Forward-Oligonukleotids mit 1 µl des dazugehörigen Reverse-Oligonukleotids gemischt und 48 µl Annealingpuffer zugegeben. Der Ansatz wurde 4 min bei 95 °C und danach für 10 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend

wurden die Oligonukleotide langsam auf 4 °C abgekühlt. Zur Phosphorylierung wurden 2 µl der abgekühlten Oligonukleotide mit 1 µl T4 Polynukleotid-Kinase (T4 PNK), 1 µl T4 PNK-Puffer und 1 µl ATP (1 mM) gemischt und auf 10 µl mit Aqua bidest. aufgefüllt. Der Ansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend 10 min bei 70 °C hitzeinaktiviert. Die Ligation von 2 µl phosphoryliertem Oligonukleotid mit 1 µl geschnittenem und dephosphoryliertem Vektor erfolgte unter Zugabe von 1 µl T4 DNA-Ligase und 1 µl T4 DNA-Ligasepuffer in einem Reaktionsvolumen von 10 µl für 1 h bei RT. Der gesamte Ligationsansatz wurde in hitzekompetente *E. coli* XL-10 gold oder XL-1 blue transformiert. Von einigen Kolonien wurde eine Plasmidisolierung und eine anschließende DNA-Sequenzierung durchgeführt. Zur weiteren Verwendung wurde von positiven Klonen eine Plasmidisolierung im großen Maßstab durchgeführt (Kapitel 3.2.2.6).

3.2.2.13 Genotypisierung

Die Isolierung genomischer DNA der LPP1-transgenen-Mäuse wurde mit Hilfe des Invisorb Spin Tissue Mini Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Von dieser DNA wurde eine PCR mit den Primern *LPP1 genotyp for* und *LPP1 genotyp rev* (Tabelle 3.1) durchgeführt. Der forward Primer ist hierbei spezifisch für mLPP1 während der reverse Primer spezifisch für die Kaninchen β -Globin 3' flankierende Region in den LPP1-transgenen-Mäuse ist. Da der reverse Primer nur in den transgenen Mäusen nicht aber in Wildtypmäusen binden kann, war im anschließenden Agarosegel in den Proben von Wildtyptieren keine Bande zu erkennen, während in den Proben der LPP1-transgenen-Mäuse eine Bande bei 584 bp zu finden war.

3.2.3 **Proteinbiochemische Methoden**

3.2.3.1 Proteinextraktion

Herstellung von Proteintotallysat

HEK293- oder N1E-115-Zellen mit einer Konfluenz von ca. 80 % wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und in Lysepuffer I mit Complete Proteaseinhibitoren auf Eis lysiert. Der weitere Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschallbehandlung (3 x 3 s) auf Eis. Danach wurde das Zelllysat für 10 min bei 14.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -20 °C gelagert.

Primäre Neurone, Astrozyten und Mikroglia wurden in PBS pelletiert und in Lysepuffer II mit Complete Proteaseinhibitoren lysiert. Der weitere Aufschluss erfolgte mittels Ultraschall

(3 x 3 s). Danach wurden die Zelllysate für 30 min auf Eis inkubiert und 5 min bei 1.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Organe wurden aus Maus- und Rattenembryonen oder postnatalen Tieren entnommen, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Für die Präparation von Gewebeproteinlysate wurden die Organe mittels ULTRA TURRAX T25 basic in Lysepuffer II mit Complete Proteaseinhibitoren homogenisiert und mittels Ultraschall (3 x 3 s) auf Eis weiter behandelt. Danach wurden die Proteinlysate 30 min auf Eis inkubiert und für 5 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 1.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Aufreinigung rekombinanter Proteine

Zur Aufreinigung rekombinanter Proteine, wurde Zelllysate aus transfizierten HEK293-Zellen mittels μMACS Epitope Tagged Protein Isolation Kit über einen GFP- oder HA-Tag nach Herstellerangaben aufgereinigt.

3.2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration von Gewebe- oder Zellproteinlysaten wurde mit Hilfe des BCA Protein Assay Kits in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte nach Herstellerangaben bestimmt. Dazu wurde die Extinktion bei 562 nm nach 30 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader gemessen und die Proteinkonzentration anhand mitgeführter BSA-Standards bestimmt.

3.2.3.3 Deglykosylierung von Proteinen

Peptid N-Glykosidase F (PNGase F)

Fünfzig μg Protein wurden mit 100 mM β -Mercaptoethanol und 1 % SDS 5 min bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ denaturiert. Anschließend wurden 28 μl PNGase F-Puffer und 5 U PNGase F zugegeben und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

Endoglykosidase H (Endo H)

Fünfzig μg Protein wurden mit 100 mM β -Mercaptoethanol und 0,2 % SDS 5 min bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ denaturiert. Danach wurden 31 μl Endo H-Puffer und 50 mU Endo H zugeben und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

3.2.3.4 Antikörperaufreinigung

Zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen LPP1 und/oder LPP1a wurden von der Firma BioGenes Kaninchen mit unterschiedlichen Peptiden (Tabelle 3.8) mehrfach immunisiert.

Fällung

Die Antiseren dieser Kaninchen wurden für 1 min bei 14.000 g zentrifugiert. Aus dem daraus resultierenden Überstand wurden die Antikörper bei 40 %-iger Sättigung mit Ammoniumsulfat durch Zugabe gesättigter Ammoniumsulfatlösung unter Rühren ausgefällt. Nach 1 h rühren bei RT wurde für 20 min bei 10.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in einer 42 %-igen Ammoniumsulfatlösung resuspendiert und erneut 20 min bei 10.000 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in PBS gelöst.

Entsalzung durch Dialyse

Dialyseschläuche (ZelluTrans Dialysiermembranen T3, Roth) wurden in 10 mM EDTA und 100 mM Natriumhydrogencarbonat in PBS aufgekocht, mit Aqua dest. gewaschen und mit PBS gespült. Der gefällte und in PBS resuspendierte Antikörper wurde in die Dialyseschläuche gefüllt und dreimal gegen jeweils frisches PBS dialysiert (2 h bei RT, über Nacht bei 4 °C, 2 h bei RT).

Ligandenkopplung und Aufreinigung

Die Kopplung der Peptide (Tabelle 3.8) und die Aufreinigung des gefällten und dialysierten Antikörpers mittels HiTrap NHS-activated HP Säulen wurde nach Herstellerangaben vorgenommen. Das Eluat wurde erneut dreimal gegen jeweils frisches PBS dialysiert. Die Antikörperkonzentration wurde mittels BCA-Assay bestimmt (Kapitel 3.2.3.2).

Spezifitätstest mit blockierendem Peptid

Zum Test der Antikörperspezifität wurden die Antikörper mit dem jeweiligen immunisierenden Peptid für 2 h bei RT inkubiert und anschließend auf einen Immunblot aufgetragen. Als Kontrolle diente BSA statt blockierendem Peptid.

3.2.3.5 Immunblot

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die SDS-PAGE wurde ein 12 %-iges Polyacrylamid-Trenngel und ein 3,75 %-iges Sammelgel gegossen. 20 bis 60 µg Probe wurden mit 3 x Probenpuffer verdünnt. Danach wurde jeweils 1 µl β-Mercaptoethanol zugegeben, 5 min bei 95 °C denaturiert und erneut 1 µl β-Mercaptoethanol zugegeben. Das Einlaufen der Proben ins Sammelgel erfolgte bei 12 V/cm die Auftrennung im Trenngel bei 18 V/cm.

Western Blot

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die Proteine aus dem Gel mittels Semi-dry-Transfer für 55 min bei 16 V auf eine Nitrozellulosemembran (Protran BA85, Whatman) übertragen.

Zur quantitativen und qualitativen Kontrolle der Proteinübertragung, wurde die Membran mit Ponceau-Rot gefärbt und dieses anschließend durch Waschen mit PBS wieder entfernt.

Antikörperinkubation

Unspezifische Bindungen wurden durch Inkubation der Membran für 1 h bei RT mit 10 % Magermilch gelöst in PBS blockiert. Die Inkubation der Primärantikörper erfolgte in der entsprechenden Verdünnung (Tabelle 3.10) über Nacht bei 4 °C in 2 ml PBS. Ungebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt, bevor der Peroxidasegekoppelte Sekundärantikörper (Tabelle 3.11) für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C zugegeben wurde. Nach anschließendem dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Detektion mittels Chemilumineszenz.

Zum Nachweis der auf dem Immunblot gebundenen Antikörper wurde die Membran mit ECL-Reagenz inkubiert. Die entstehende Chemilumineszenz wurde durch Auflegen und anschließende Entwicklung eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

3.2.4 Immunchemische Färbemethoden

3.2.4.1 Immunzytochemische Färbungen

Für immunchemische Färbungen wurden N1E-115-Zellen, HEK293-Zellen oder primäre Neurone in eiskaltem 4 %-igem PFA mit 15 % Saccharose für 20 min bei RT fixiert. Anschließend wurde 3 x 10 min mit PBS gewaschen und mit 0,1 % Triton-X-100 und 0,1 % Natriumzitat für 3 min bei 4 °C permeabilisiert. Nach erneutem Waschen wurde mit 10 %-igem FKS in PBS und 0,02 % Thimerosal für 1 h bei RT geblockt. Der Primärantikörper wurde in der entsprechenden Verdünnung (Tabelle 3.10) in 10 % FKS mit 0,02 % Thimerosal über Nacht bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden Alexa-Fluor- oder Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (Tabelle 3.11), verdünnt in PBS mit 10 % FKS, für 1 h bei RT. Als Negativkontrolle wurden Zellen ohne Primärantikörper parallel behandelt. Zur Färbung des Aktinzytoskeletts wurden die Zellen nach anschließendem Waschen mit Rhodamin-Phalloidin nach Herstellerangaben behandelt und mit Immu-Mount eingedeckelt.

3.2.4.2 Immunhistochemische Färbungen

Embryonalen Mäusen wurden die Gehirne an E14,5 E15,5 oder E18,5 entnommen und für zwei Tage bei 4 °C in 4 % PFA fixiert. Postnatale Mäuse wurden bei P5 mit einer Ketamin-Mischung anästhesiert und durch vaskuläre Injektion mit einer 0,9 M NaCl-Lösung gefolgt von 4 % PFA perfundiert. Die Gehirne wurden entnommen und in 4 % PFA über Nacht bei

4 °C gelagert. Anschließend wurden die Gehirne mit 0,1 M PB gewaschen und in 4 % Agarose eingebettet. Von den Gehirnen wurden 70 µm dicke, horizontale Vibratonschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden zwei Mal mit 0,1 M PB gewaschen, in Blockierungslösung für 1 h bei RT inkubiert und mit in Blockierungslösung verdünntem Primärantikörper (Tabelle 3.10) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde erneut gewaschen und mit Alexa-Flour- oder Cy3-konjugiertem in Blockierungslösung verdünntem Sekundärantikörper (Tabelle 3.11) ohne Triton-X-100 für 1 h 30 min bei RT inkubiert. Nach Waschen mit 0,1 M PB wurden die Zellkerne für 5 min mit Hoechst-Lösung in einer Verdünnung von 1:20.000 angefärbt und erneut gewaschen. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und mit Immu-Mount eingedeckelt.

Zur immunhistochemischen Färbung von BrdU wurden die Gehirne nach der Fixierung mit 2 N HCl für 30 min bei 37 °C behandelt und anschließend für 10 min bei RT mit 0,1 M Boratpuffer gewaschen. Danach wurden die Schnitte zwei Mal mit 0,1 M PB gewaschen, in Blockierungslösung für 1 h bei RT inkubiert und mit in 0,1 M PB verdünntem Anti-BrdU über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Gehirne wie oben beschrieben weiter behandelt.

3.2.5 Mikroskopie und statistische Auswertung

3.2.5.1 Konfokale Mikroskopie

Immunzytochemische und immunhistochemische Färbungen wurden mit Hilfe des Konfokalen Laser Scanning Mikroskops aufgenommen. Aufnahmen bei einer Wellenlänge von 405 nm wurden mit einem blauen Diodenlaser angefertigt. Außerdem wurden ein Argon-Ionen-Laser für Aufnahmen bei 488 nm und ein Helium-Neon-Laser für 543 nm eingesetzt. Es wurden je nach Fragestellung entweder einzelne konfokale Aufnahmen oder durch die Überlagerung mehrerer konfokaler Aufnahmen sogenannte „z-stacks“ angefertigt. Die Überlagerung unterschiedlicher Farbkanäle sowie die Hintergrundkorrektur wurden gegebenenfalls mit der Software des Konfokalmikroskops oder mit dem Programm Corel Draw vorgenommen.

3.2.5.2 Längenbestimmung von Neuriten

Zur Neuritenlängenmessung wurden N1E-115-Zellen mit GFP-Fusionsproteinen oder shRNA-Plasmiden transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurde das Kulturmedium gegen serumfreies OPTIMEM ausgetauscht und 5 h danach wurden die Zellen fixiert und gefärbt. Von den Zellen wurden Aufnahmen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Olympus BX

50) angefertigt. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der MetaMorph Software. Hierbei wurden alle Neuriten mit einer Länge von $>2 \mu\text{m}$ berücksichtigt.

3.2.5.3 Quantifizierung der kortikalen Migration

Für die Auswertung der Position der *in utero* elektroporierten Neurone bei E18,5 und P5 wurde der Kortex in acht gleich große Abschnitte unterteilt. Abschnitt 1 umfasst die Marginalzone und die Abschnitte 2 - 8 die kortikale Platte bis zum Beginn der Intermediärzone. Die Anzahl GFP-positiver Neurone in jedem Abschnitt wurde bestimmt und danach der Anteil der GFP-positiven Zellen in den einzelnen Abschnitten berechnet [110]. Pro Embryo wurden 60 bis 300 GFP-positive Neurone gezählt. Der Mittelwert aller Embryonen wurde berechnet.

Zur Auswertung der Position der *in utero* elektroporierten Neurone bei E15,5 wurde die Anzahl der GFP-positiven Neurone in der (sub)ventrikulären Zone, der Intermediärzone und der kortikalen Platte bestimmt. Zur besseren Unterscheidung der einzelnen Zonen wurden die Zellkerne mit Hoechst-Lösung gefärbt. Anschließend wurde der Anteil GFP-positiver Neurone in den einzelnen Zonen bestimmt und der Mittelwert aller Embryonen berechnet. Pro Embryo wurden 400 bis 800 GFP-positive Neurone gezählt.

An E14,5 wurde zur quantitativen Analyse der prozentuale Anteil BrdU- bzw. Phospho-H3-positiver Zellen an allen GFP-positiven Zellen in der ventrikulären Zone bestimmt und hiervon der Mittelwert aller Embryonen pro Versuchsbedingung berechnet. Pro Embryo wurden 50 bis 100 GFP-positive Neurone gezählt.

3.2.5.4 Statistik

Zur statistischen Auswertung der in dieser Arbeit präsentierten Versuchsergebnisse wurden die Mittelwerte der Daten gebildet und anschließend die Standardabweichung bzw. der Standardfehler berechnet. Für die statistische Auswertung der *in utero* Elektroporations-Daten bei E18,5 und P5 wurde die mittlere Position der Neurone (D_m) für jeden Embryo wie folgt berechnet: $\Sigma(N_i D_i) / \Sigma(N_i)$, wobei N_i die Anzahl der GFP-positiven Neurone im Abschnitt D_i ist. Der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes für n Embryonen wurden anschließend ermittelt [110].

Zur statistischen Analyse der Versuchsergebnisse mittels ungepaartem Students t-Test oder Mann-Whitney-U-Test wurde die Software SPSS verwendet. P-Werte von $<0,05$ wurden als signifikant angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zu PRG3

4.1.1 Aufreinigung und Spezifitätstest polyklonaler Antikörper gegen PRG3

Bisher konnte von Savaskan et al. mittels Northern Blot nachgewiesen werden, dass die stärkste *PRG3*-mRNA-Expression im Gehirn vorliegt. Weitere Transkripte konnten, wenn auch in einer wesentlich geringeren Menge, in Leber, Niere und Hoden detektiert werden [103]. Im Gegensatz dazu konnten Sigal et al. PRG3-Protein mittels Immunblot in allen untersuchten Geweben (Niere, Leber, Lunge, Gehirn, Milz und Herz) nachweisen. In dieser Arbeit trat die stärkste Proteinexpression in Niere, Lunge und Milz auf [107]. Aufgrund der Inkonsistenz dieser mRNA- und Protein-Daten für PRG3 sollte die entwicklungs- und gewebeabhängige PRG3-Expression zunächst systematisch untersucht werden.

4.1.1.1 Auswahl und Affinitätsaufreinigung der PRG3-Antikörper

Da es keinen funktionierenden, kommerziell erhältlichen PRG3-Antikörper gibt, wurden im Vorfeld dieser Arbeit von der Firma BioGenes Kaninchen mit PRG3-spezifischen Peptiden immunisiert. Hierzu wurde sowohl ein Peptid aus der ersten extrazellulären Schleife von PRG3 als auch Peptide aus dem intrazellulären C-Terminus von PRG3 ausgewählt. Diese Peptide wurden so gewählt, dass sie sich in ihrer Aminosäuresequenz um mindestens 50 % von PRG1, -2, -4 und -5 unterschieden, um ungewollte Kreuzreaktivität mit anderen PRGs auszuschließen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Immunsereen dieser Kaninchen im Immunblot auf ihre Spezifität gegenüber Totalproteinlysat von GFP-rPRG3-überexprimierenden HEK293-Zellen, rekombinantem aufgereinigtem GFP-mPRG3 und HA-rPRG3 (HA = Hämagglutinin) sowie Totalproteinlysat aus Mauskortex (P5) getestet. Von den untersuchten Antikörpern wurden die zwei Seren mit den eindeutigsten Signalen im Immunblot ausgewählt. Hierbei handelte es sich in beiden Fällen um Seren, die den Kaninchen nach der dritten Immunisierung entnommen worden waren. Als immunisierendes Peptid hatte beim ersten Serum ein Peptid aus der ersten extrazellulären Schleife (Aminosäuren 53 – 66, Anti-PRG3 53) und beim zweiten Serum eines aus dem intrazellulären C-Terminus von PRG3 (Aminosäuren 296 - 309, Anti-PRG3 296, Abbildung 4.1A) gedient. Die PRG3-Aminosäuresequenz von rPRG3 und mPRG3 ist für diese beiden Peptide identisch, weshalb beide Antiseren sowohl GFP-mPRG3 als auch GFP-rPRG3 detektieren konnten.

Da beide Seren im Immunblot einen relativ starken Hintergrund erzeugten und neben den für PRG3-spezifischen Banden vor allem im Mauskortex zusätzliche unspezifische Banden

detektierten, erfolgte eine Aufreinigung der Seren mittels Affinitätschromatographie. Die Affinitätsaufreinigung wurde gegen das Peptid durchgeführt, mit dem das jeweilige Kaninchen immunisiert worden war. Anschließend wurde das Eluat der Aufreinigung erneut im Immunblot getestet. Beide Antikörper erkannten korrekterweise GFP-rPRG3 und GFP-mPRG3 bei ca. 62 kDa und HA-rPRG3 bzw. endogenes PRG3 aus Mauskortex, oberhalb von 32 kDa (Abbildung 4.1B). Dies entspricht dem theoretischen Molekulargewicht von r- bzw. mPRG3, das bei ca. 36 kDa liegt. Das Molekulargewicht von GFP beträgt 27 kDa, weshalb das Fusionsprotein GFP-PRG3 ein theoretisches Molekulargewicht von 63 kDa besitzt (berechnet mit Hilfe des ExPASy Compute pI/MW tools).

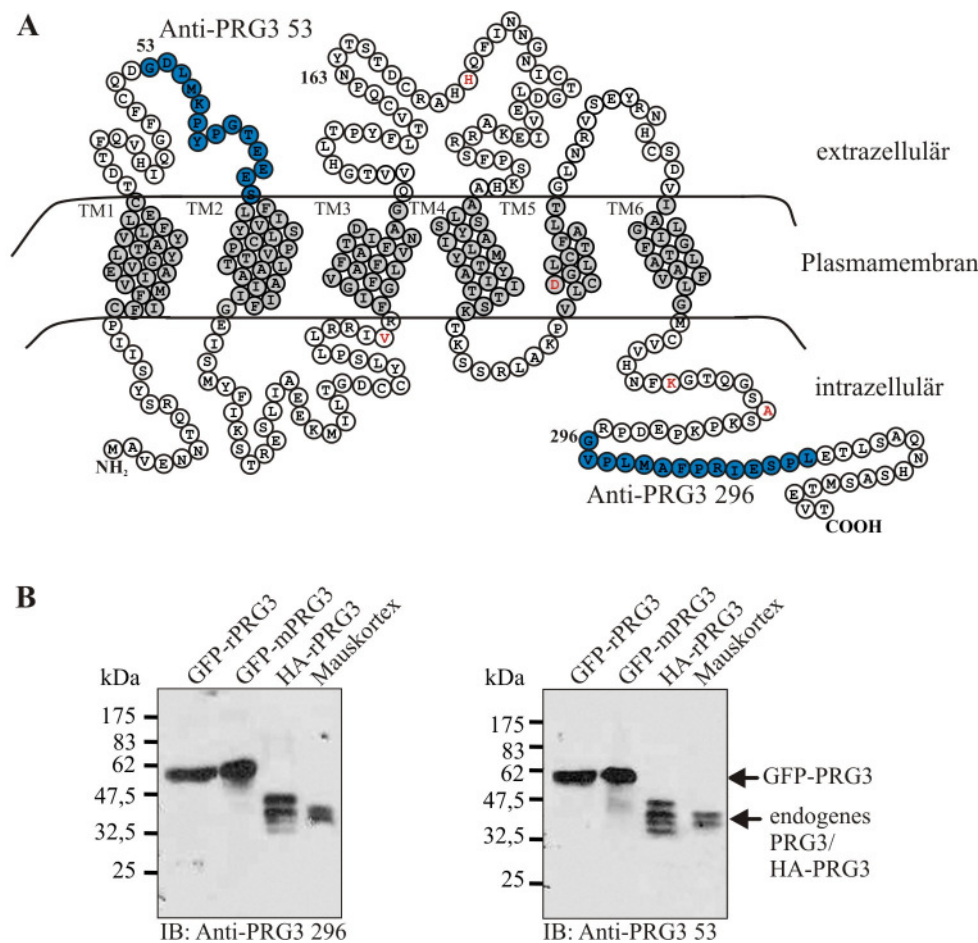


Abbildung 4.1: Auswahl PRG3-spezifischer Immunsere. (A) Kugelmodell von rPRG3 (NCBI-Nummer AY299399): blau gekennzeichnet sind die Aminosäuren der Peptide, mit denen die Kaninchen zur Produktion der Antikörper immunisiert wurden. Die fünf Aminosäuren, in denen sich die rPRG3- von der mPRG3-Sequenz (NCBI-Nummer AY345342) unterscheidet, sind rot dargestellt. Mutmaßliche Membrandomänen wurden in Anlehnung an [103] eingezeichnet. (B) Immunsere von mit unterschiedlichen PRG3-spezifischen Peptiden immunisierten Kaninchen wurden nach der Affinitätsaufreinigung im Immunblot gegen Totalproteinlysate aus GFP-rPRG3-überexprimierenden HEK293-Zellen, rekombinantem aufgereinigtem GFP-mPRG3 bzw. HA-rPRG3 und gegen Mauskortex-Proteinlysate (P5) getestet. Zur weiteren Verwendung wurden Seren von Kaninchen ausgewählt, die mit einem Peptid aus dem intrazellulären C-Terminus von PRG3 (links, Anti-PRG3 296) bzw. einem Peptid gegen den ersten extrazellulären Loop von PRG3 immunisiert wurden (rechts, Anti-PRG3-53). Dargestellt sind repräsentative Immunblots der beiden Seren nach Affinitätsaufreinigung gegen das entsprechende Peptid.

4.1.1.2 Spezifität der aufgereinigten PRG3-Antikörper

Zur Untersuchung der Spezifität der aufgereinigten Antikörper im Immunblot wurde ein Test mit blockierendem Peptid durchgeführt. Dazu wurden die beiden PRG3-Antikörper mit dem Peptid vorinkubiert, gegen welches der jeweilige Antikörper generiert wurde. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Peptid-Antikörper-Gemisch auf eine Western Blot-Membran mit GFP-rPRG3- und Mauskortex-Proteinlysaten gegeben. Als Kontrolle wurden die Antikörper anstatt des Peptids mit BSA vorinkubiert bzw. der Antikörper ohne Vorbehandlung auf eine identische Membran gegeben (Abbildung 4.2).

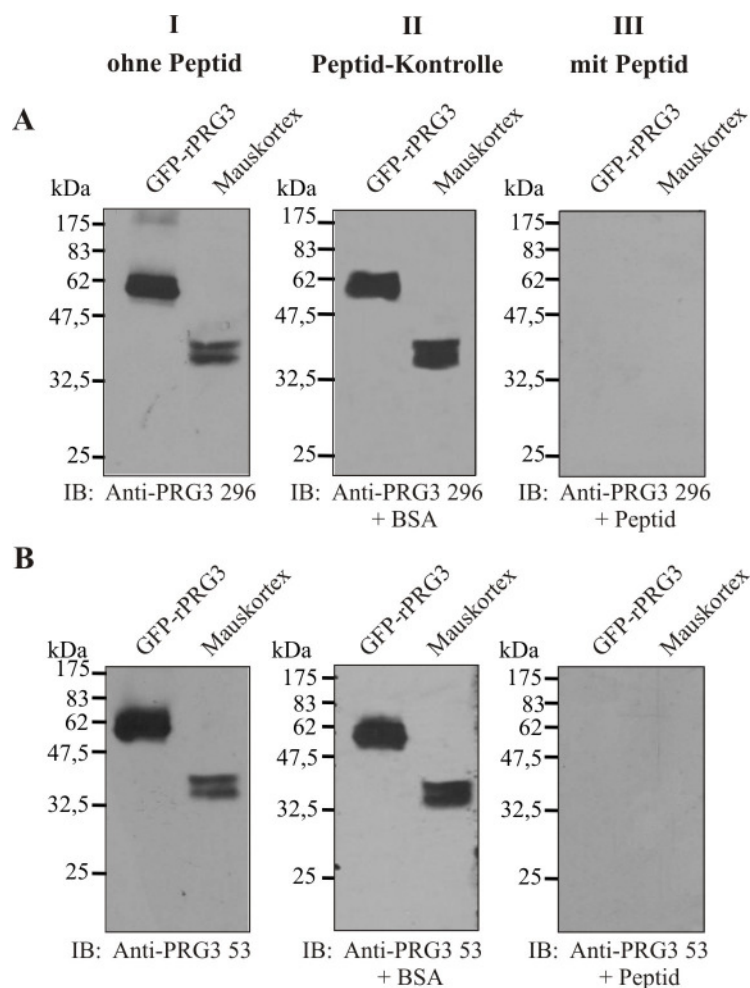


Abbildung 4.2: Spezifitätstest der PRG3-Antikörper mit blockierendem Peptid. Die Antikörper wurden mit dem Peptid vorinkubiert, mit dem das jeweilige Kaninchen immunisiert worden war (III). Als Kontrolle wurden die Antikörper mit BSA (II) bzw. einer reinen Antikörperverdünnung (I) inkubiert, bevor sie auf die Membran mit GFP-rPRG3 oder Mauskortex-Proteinlysate gegeben wurden. **(A)** Anti-PRG3 296, **(B)** Anti-PRG3 53. Durch Vorinkubation des Antikörpers mit dem entsprechenden Peptid konnte die Detektion von GFP-rPRG3 oder endogenem PRG3 im Mauskortex bei beiden Antikörpern verhindert werden.

Sowohl der gegen den extrazellulären Loop (Anti-PRG3 53) als auch der gegen den C-Terminus (Anti-PRG3 296) von PRG3 gerichtete Antikörper erkannte nach Vorinkubation mit dem blockierenden Peptid im Immunblot kein Protein mehr. Im Gegensatz dazu waren

auf den Membranen, die mit einer reinen Antikörperverdünnung oder einer Antikörperverdünnung mit BSA inkubiert worden waren, sowohl GFP-rPRG3 als auch endogenes PRG3 bei ca. 62 bzw. 36 kDa nachweisbar (Abbildung 4.2). Da sich beide Antikörper im Immunblot als spezifisch erwiesen hatten, wurden alle Experimente in dieser Arbeit zur Kontrolle mit beiden Antikörpern durchgeführt, was in allen Fällen zu identischen Ergebnissen führte. Im Folgenden sind daher nur die Immunblotergebnisse mit Anti-PRG3 53 dargestellt. Da bei immunzytochemischen Färbungen die Detektion mit Anti-PRG3 296 bei identischem Färbemuster ein stärkeres Signal erzeugte, wurden in dieser Arbeit die immunzytochemischen Ergebnisse mit diesem Antikörper dargestellt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass beide ausgewählten und aufgereinigten PRG3-Antikörper (Anti-PRG3 53 und Anti-PRG3 296) im Immunblot eine spezifische Detektion von rekombinantem und endogenem PRG3 ermöglichen.

4.1.2 Posttranslationale Modifikation von PRG3

Da einige Mitglieder der LTP-Familie auf der zweiten extrazellulären Schleife eine funktionelle Glykosylierungssequenz besitzen [80, 91, 111, 112], wurde in dieser Arbeit eine mögliche N- und/oder O-Glykosylierung von PRG3 untersucht.

4.1.2.1 N-Glykosylierung von PRG3

Zum Nachweis einer möglichen N-Glykosylierung wurde Totalproteinlysate aus HA-rPRG3-überexprimierenden HEK293-Zellen mit Hilfe des Enzyms Peptid N-Glykosidase F (PNGase F) deglykosyliert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran geblottet und mit einem HA-Antikörper nachgewiesen. PNGase F spaltet spezifisch N-glykosylierte Zucker von Proteinen ab [113, 114]. Vor der Deglykosylierung mit PNGase F war HA-rPRG3 als Dreifachbande zwischen 35 und 40 kDa nachweisbar. Nach der Deglykosylierung war nur noch die unterste Bande bei 35 kDa detektierbar (Abbildung 4.3A). Dies zeigt, dass es sich bei den beiden oberen, langsamer migrierenden Banden um N-glykosylierte Formen von PRG3 handelt und die Bande bei 35 kDa die unglykosylierte Form von PRG3 darstellt. Auch endogenes PRG3 aus Mausgehirn, das sich vor der Deglykosylierung mit PNGase F als Doppelbande zwischen 37 und 40 kDa im Immunblot darstellte, wurde zu einer einzigen Bande bei 35 kDa deglykosyliert (Abbildung 4.3B).

Als zusätzlicher Nachweis für eine N-Glykosylierung wurden HEK293-Zellen mit Tunicamycin behandelt und später mit 3xFLAG-rPRG3 transfiziert. Tunicamycin ist ein Antibiotikum, das die eukaryotische N-Acetylglucosamintransferase inhibiert und dadurch die N-Glykosylierung neu synthetisierter Proteine verhindert [91]. 3xFLAG-rPRG3 aus Tunicamycin-behandelten HEK293-Zellen erschien im Immunblot nach Inkubation mit einem FLAG-Antikörper ebenfalls als Einzelbande bei 35 kDa. 3xFLAG-rPRG3 aus unbehandelten Kontrollzellen war dagegen im Immunblot weiterhin als Dreifachbande zwischen 35 und 40 kDa nachweisbar (Abbildung 4.3C). Dieses Ergebnis bestätigt, dass PRG3 N-glykosyliert wird.

Die bestätigte N-Glykosylierung sollte in zusätzlichen Versuchen genauer charakterisiert werden. Hierzu wurde eine Endoglykosidase H-Behandlung (Endo H) von Gehirnproteinlysaten durchgeführt. Während PNGase F sämtliche N-gekoppelte Kohlenhydrate abspaltet, sind nur die stark mannosehaltigen Formen sensitiv gegenüber einer Spaltung durch Endo H. Nach Modifikation im Golgi-Apparat sind N-gekoppelte Kohlenhydrate hingegen resistent gegenüber einer Endo H-Hydrolyse [91]. Die Inkubation von Proteinlysaten mit Endo H führte im Gegensatz zur Behandlung mit PNGase F zu keiner Veränderung des Bandenmusters im Immunblot (Abbildung 4.3B). Nur die obere, langsamer migrierende Bande bei 40 kDa nahm in ihrer Intensität leicht ab, es gab aber keine neue, schneller migrierende Bande bei 35 kDa wie nach Behandlung mit PNGase F. Offensichtlich war die Glykosylierung von PRG3 weitgehend resistent gegenüber einer Spaltung durch Endo H, was darauf hinweist, dass PRG3 zum Zeitpunkt der Zellyse das endoplasmatische Retikulum bereits verlassen hatte (Abbildung 4.3B).

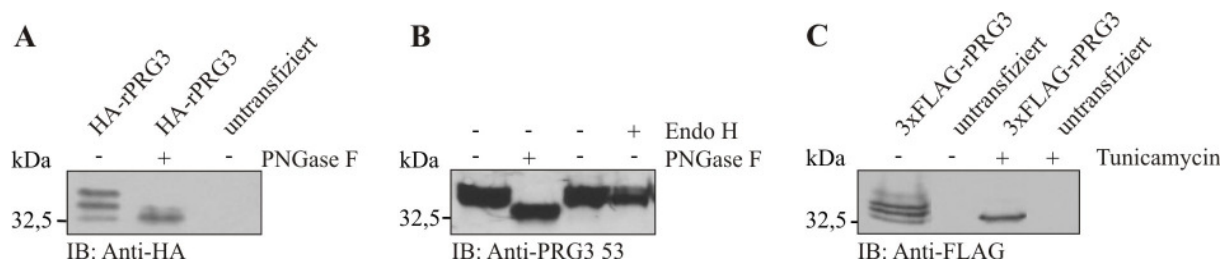


Abbildung 4.3: Nachweis einer N-Glykosylierung in endogenem und rekombinantem PRG3. (A) HEK293-Zellen wurden mit HA-rPRG3 transfiziert und einen Tag nach Transfektion lysiert. Totalproteinlysate wurden mit PNGase F behandelt und anschließend im Immunblot analysiert. Der Nachweis erfolgte mit einem HA-Antikörper. Als Kontrolle wurde Totalproteinlysate der HA-rPRG3-transfizierten HEK293-Zellen ohne PNGase F-Behandlung aufgetragen. (B) Proteinlysate aus Mausgehirn (P5) wurden mit PNGase F oder Endo H inkubiert und anschließend im Immunblot analysiert. Als Kontrolle wurde Proteinlysate mit den gleichen Puffern und bei identischen Temperaturen nur ohne das jeweilige Enzym behandelt. Endogenes PRG3 wurde mittels Anti-PRG3 53 detektiert. (C) HEK293-Zellen wurden mit Tunicamycin (Inhibitor der *de novo* N-Glykosylierung) behandelt, später mit 3xFLAG-rPRG3 transfiziert und einen Tag nach der Behandlung lysiert. Totalproteinlysate wurden im Immunblot analysiert. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mit 3xFLAG-rPRG3 transfiziert. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe eines FLAG-Antikörpers. In allen drei Versuchen konnte eine N-Glykosylierung von PRG3 nachgewiesen werden.

Als nächstes sollte die Aminosäuresequenz *in silico* identifiziert werden, an der PRG3 N-glykosyliert wird. Mittels motivbasierter Vorhersage möglicher N-Glykosylierungsstellen (NetNGlyc 1.0 Server) konnten drei Sequenzen mit dem Konsensusmotiv NX[ST] (N = Asparagin, S = Serin, T = Threonin) identifiziert werden, wobei X jede Aminosäure außer Prolin darstellen kann. Da zwei dieser Sequenzen intrazellulär am N- bzw. C-Terminus von PRG3 lokalisiert sind (Aminosäure 5 bzw. 316), N-Glykosylierungen jedoch üblicherweise nur extrazellulär auftreten [115], kommt als tatsächliche Glykosylierungsstelle nur die Aminosäure 163 auf der zweiten extrazellulären Schleife in Betracht (Abbildung 4.4A/B).

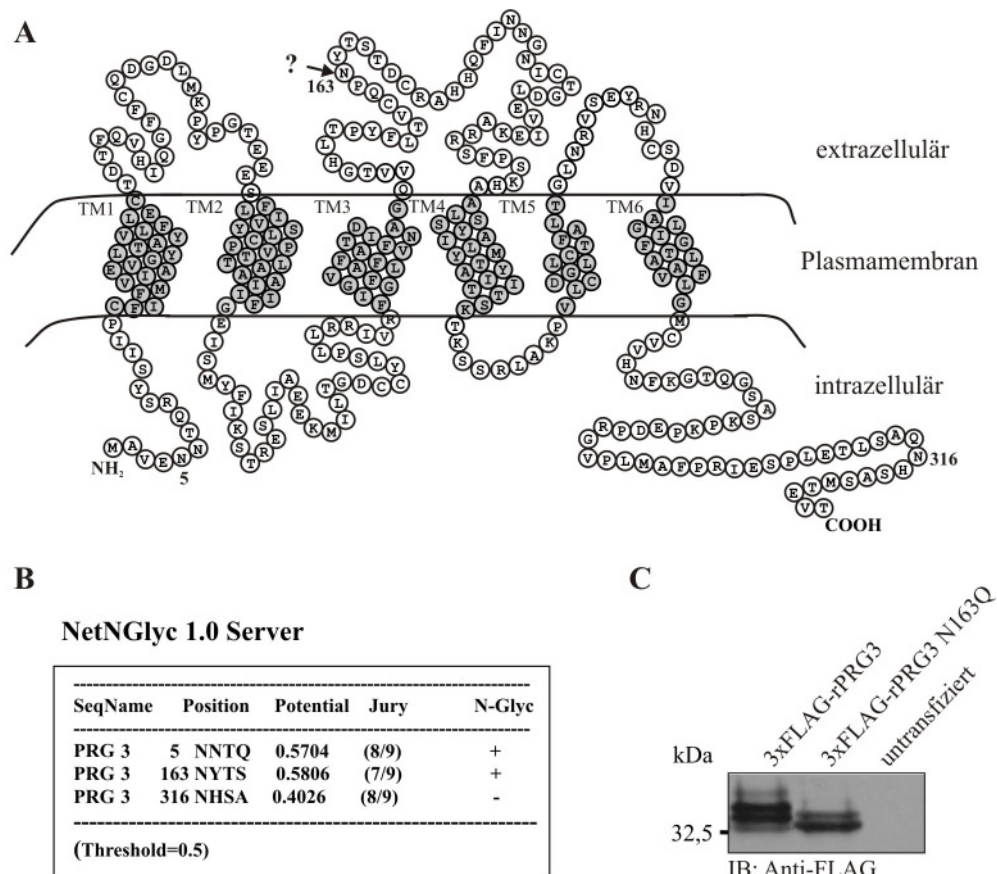


Abbildung 4.4: PRG3 ist am Asparagin 163 N-glykosyliert. (A) Die Lokalisation der N-Glykosylierungsstelle im PRG3-Kugelmodell bei Aminosäure 163 ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. (B) Ergebnisse der motivbasierten Vorhersage *in silico* möglicher N-Glykosylierungsstellen mit Hilfe des NetNGlyc 1.0 Servers (C) Im für 3xFLAG-rPRG3 kodierenden Expressionsplasmid wurde die Nukleinsäuresequenz des Asparagin 163 zu Glutamin mutiert (3xFLAG-rPRG3 N163Q). Dieses mutierte und das Wildtypkonstrukt wurden in HEK293-Zellen transfiziert. Anschließend wurden die Totalproteinlysate im Immunblot analysiert. Der Nachweis erfolgte mit einem FLAG-Antikörper. Dabei zeigt sich Asparagin 163 an der N-Glykosylierung von PRG3 beteiligt.

Zur Überprüfung dieser theoretischen Vorhersage wurde in 3xFLAG-rPRG3 die Nukleinsäuresequenz des Asparagin 163 zu einer für Glutamin kodierenden Sequenz mutiert (3xFLAG-rPRG3 N163Q). Das mutierte Plasmid wurde in HEK293-Zellen transfiziert und Totalproteinlysate dieser Zellen hergestellt. Im anschließenden Immunblot erschien

3xFLAG-rPRG3 N163Q als Doppelbande zwischen 35 und 37 kDa, wobei die obere der beiden Banden deutlich schwächer ausgeprägt war als die bei 35 kDa. Die oberste Bande des Wildtyp 3xFLAG-rPRG3 Proteins bei 40 kDa war dagegen vollständig verschwunden (Abbildung 4.4C). Das Asparagin 163 ist also offensichtlich an der N-Glykosylierung von PRG3 beteiligt.

4.1.2.2 Funktionelle Bedeutung der N-Glykosylierung von PRG3

Da bereits bekannt war, dass die Überexpression von PRG3 in unterschiedlichen Zelllinien wie N1E-115 (Maus-Neuroblastomzellen), Cos7 (Affen-Nierenzellen) oder HeLa (menschliche Zervixkarzinomzellen) zur Ausbildung von Filopodien führt [103, 107], sollte geklärt werden, ob die N-Glykosylierung von PRG3 für die Filopodienbildung funktionell von Bedeutung ist. Auch in HEK293-Zellen führte die Überexpression von 3xFLAG-rPRG3 zur Ausbildung von Filopodien auf der gesamten Zelloberfläche. Die immunzytochemische Färbung mit einem FLAG-Antikörper ergab, dass 3xFLAG-rPRG3 unter anderem in diesen Filopodien lokalisiert war. Nach Transfektion der Glykosylierungsmutante 3xFLAG-rPRG3 N163Q in HEK293-Zellen kam es dagegen nicht zum Auswachsen von Filopodien (Abbildung 4.5A). Darüber hinaus war das mutierte nicht N-glykosylierte PRG3-Protein im Gegensatz zum Wildtyp-Protein ausschließlich in intrazellulären Kompartimenten und nicht in der Plasmamembran lokalisiert wie aus der Überlagerung der FLAG-Färbung mit den dazugehörigen Laser-Transmissionsaufnahmen zu entnehmen ist (Abbildung 4.5B).

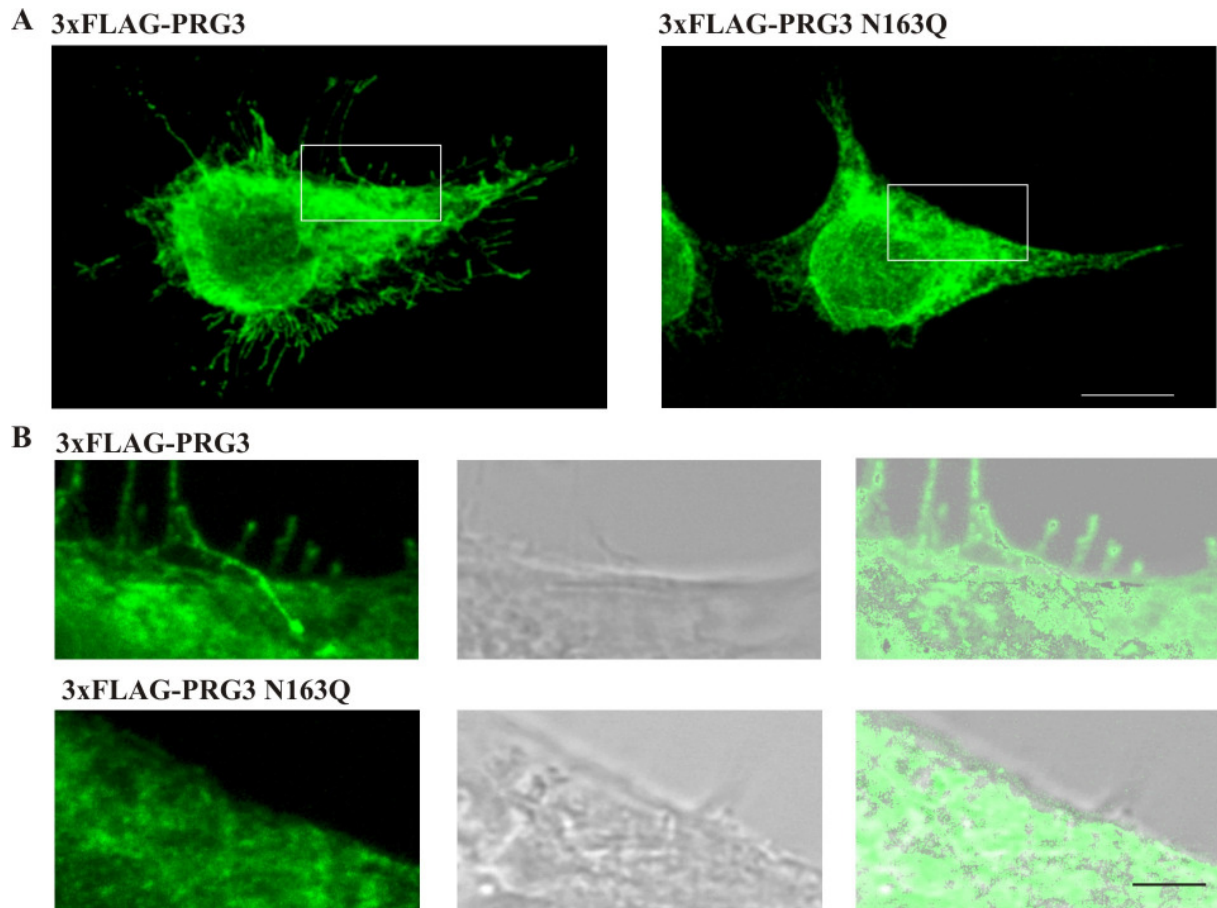


Abbildung 4.5: Die Mutation von PRG3 an der Aminosäure 163 von Asparagin zu Glutamin verhindert die Ausbildung von Filopodien durch PRG3. (A) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von HEK293-Zellen, die mit 3xFLAG-rPRG3 (links) oder 3xFLAG-rPRG3 N163Q (rechts) transfiziert und immunzytochemisch mit einem FLAG-Antikörper gefärbt wurden. Das weiße Rechteck markiert den Bereich, der für die Vergrößerung ausgewählt wurde. Balken: 10 µm. (B) 3xFLAG-rPRG3 (oben) ist im Gegensatz zu 3xFLAG-rPRG3 N163Q (unten) in der Plasmamembran lokalisiert wie an der Überlagerung von fluoreszenzmikroskopischen und Laser-Transmissionsaufnahmen der Zellen zu sehen ist. Balken: 2,5 µm.

4.1.2.3 O-Glykosylierung von PRG3

Zum Nachweis einer eventuellen zusätzlichen O-Glykosylierung wurden HEK293-Zellen mit Benzyl-2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosid (Benzyl-Gal-NAc) behandelt und später mit 3xFLAG-rPRG3 transfiziert. Benzyl-Gal-NAc inhibiert O-Glykosylierungen *in vitro* [116]. 3xFLAG-rPRG3 aus HEK293-Zellen, die mit Benzyl-Gal-NAc inkubiert worden waren, zeigten im Immunblot mit einem FLAG-Antikörper ebenso wie die Kontrollzellen eine Doppelbande zwischen 37 und 40 kDa (Abbildung 4.6). Da die Inhibition der O-Glykosylierung in HEK293-Zellen keinen Einfluss auf das Molekulargewicht von 3xFLAG-rPRG3 hatte, ist PRG3 nicht O-glykosyliert.

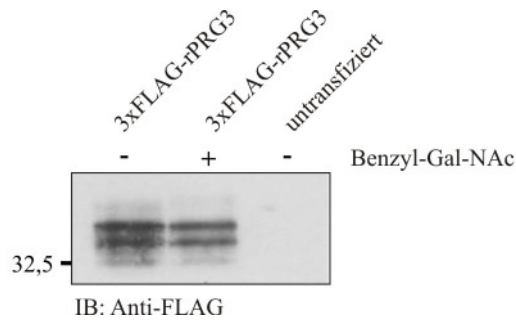


Abbildung 4.6: Nachweis einer möglichen O-Glykosylierung von PRG3 im Immunblot. HEK293-Zellen wurden mit dem O-Glykosylierungsinhibitor Benzyl-Gal-NAc behandelt, später mit 3xFLAG-rPRG3 transfiziert und einen Tag danach lysiert. Als Kontrolle diente Totalproteinlysate von Zellen, die ohne Benzyl-Gal-NAc-Behandlung mit 3xFLAG-rPRG3 transfiziert wurden. Die Proteinlysate wurden im Immunblot analysiert. Der Nachweis erfolgte mit einem FLAG-Antikörper. Da das PRG3-Bandenmuster der mit Benzyl-Gal-NAc behandelten und unbehandelten Zellen im Immunblot identisch war, ergab dieser Versuch keinen Hinweis auf eine O-Glykosylierung von PRG3.

Aus den Glykosylierungsanalysen lässt sich schlussfolgern, dass PRG3 am Asparagin 163 auf der zweiten extrazellulären Schleife N-glykosyliert wird. Diese N-Glykosylierung hat einen Einfluss auf den Transport von PRG3 in die Plasmamembran und die PRG3-induzierte Ausbildung von Filopodien in HEK293-Zellen.

4.1.3 Endogene PRG3-Expression

Bisher ist nur wenig und teilweise Widersprüchliches über die endogene PRG3-Expression bekannt (Details siehe Kapitel 4.1.1). Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit die endogene Expression von PRG3 in unterschiedlichen Zellen und Geweben zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten untersucht.

4.1.3.1 PRG3-Expression in unterschiedlichen Mausgeweben

Mittels quantitativer Real-time RT-PCR wurde die PRG3-Expression in unterschiedlichen Mausgeweben am postnatalen Tag 5 und 30 (P5 und P30) analysiert. Diese Stadien wurden ausgewählt, da es sich bei P5 um ein frühes postnatales Stadium handelt, während die Gehirnentwicklung an P30 schon weitgehend abgeschlossen ist. Zur Optimierung der quantitativen Real-time RT-PCR wurden vor jeder neuen Versuchsreihe stets drei verschiedene Standardgene (*β-Aktin*; *Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase*, *GAPDH*; *Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase*, *HPRT*) getestet und davon dasjenige ausgewählt, das in den zu analysierenden Proben nicht selber reguliert war. Die Ergebnisse sind entsprechend im Folgenden immer nur mit einem der Standardgene dargestellt. Für die quantitative Real-time RT-PCR wurden von allen in dieser Arbeit vorliegenden Experimenten

jeweils drei unabhängige Versuche durchgeführt und für jeden dieser Versuche wurde das Gewebe von mindestens drei Tieren vereinigt.

Im Gehirn konnte sowohl an P5 als auch an P30 eine starke *PRG3*-Expression nachgewiesen werden. In der Niere und Leber war die Expression etwa 10-fach niedriger. Weiterhin konnten noch geringe mRNA-Mengen in Leber und Hoden nachgewiesen werden. In Milz und Thymus war die *PRG3*-Expression unterhalb der Detektionsgrenze (Abbildung 4.7).

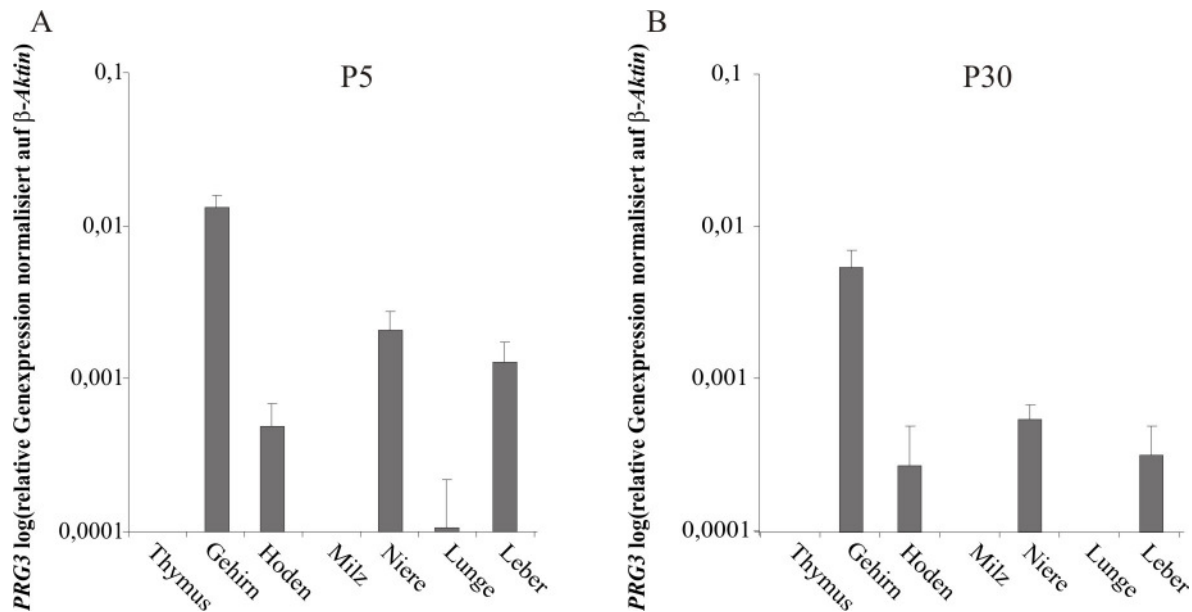


Abbildung 4.7: *PRG3*-mRNA Expression in unterschiedlichen Mausgeweben. Quantitative Real-time RT-PCR für *PRG3* von unterschiedlichen Mausgeweben an P5 (A) und P30 (B). Die stärkste *PRG3*-mRNA-Expression wurde im Gehirn beobachtet. Die Daten wurden auf β -Aktin normalisiert. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD von n = 3 Experimenten. Pro Experiment wurde das Gewebe von mindestens drei Mäusen vereinigt.

Auf Proteinebene konnte sowohl an P5 als auch an P30 eine endogene *PRG3*-Expression ausschließlich in Gehirnproteinlysaten nachgewiesen werden. In anderen Mausgeweben konnte innerhalb der Detektionsgrenzen des Immunblots im Gegensatz zur *PRG3*-mRNA kein *PRG3*-Protein nachgewiesen werden (Abbildung 4.8). Diese Versuche wurden mit beiden *PRG3*-Antikörpern (Kapitel 4.1.1) durchgeführt und kamen zu identischen Ergebnissen.

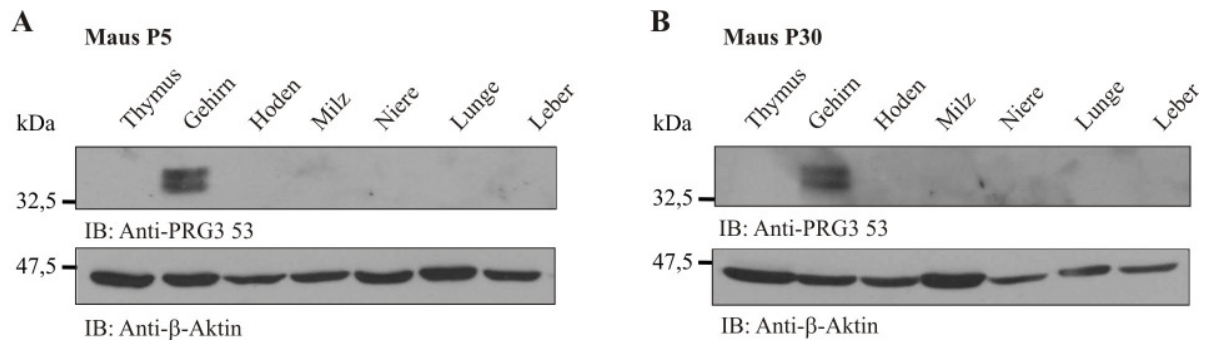


Abbildung 4.8: PRG3-Protein-Expression in unterschiedlichen Mausgeweben. Repräsentative Immunblots verschiedener Mausgewebe, die an P5 (A) oder P30 (B) entnommen und zu Totalproteinlysate verarbeitet worden waren. Der Nachweis erfolgte mit Anti-PRG3 53 und Anti-PRG3 296. Da der Nachweis mit beiden Antikörpern zu identischen Ergebnissen führte, werden nur die Immunblots mit Anti-PRG3 53 dargestellt. Für jedes Experiment wurde das Gewebe von mindestens drei Mäusen vereinigt. Als Ladekontrolle wurden die Membranen anschließend mit Anti-β-Aktin inkubiert.

4.1.3.2 PRG3-Expression während der Entwicklung

Des Weiteren sollte die entwicklungsabhängige Regulation von PRG3 in unterschiedlichen Gehirnregionen untersucht werden. Die quantitative Real-time RT-PCR zeigte eine geringfügig ansteigende *PRG3*-mRNA-Expression in der späten Embryonalentwicklung sowohl im Hippocampus als auch im Kortex. Die stärkste *PRG3*-Expression konnte in späten embryonalen und frühen postnatalen Stadien nachgewiesen werden. Nach der Geburt nimmt sie stark ab, sodass sich die Expression zwischen P0 und P30 sowohl im Hippocampus als auch im Kortex auf ungefähr ein Dreißigstel reduzierte (Abbildung 4.9A, B). Im Cerebellum und im Bulbus olfaktorius wurde die stärkste *PRG3*-Expression in den embryonalen Stadien E14 und E16 gemessen. Danach sank die *PRG3*-Expression bis P30 stetig auf ca. ein Achtzigstel im Cerebellum und ein Zwanzigstel im Bulbus olfaktorius im Bezug auf das Niveau an E14 bzw. E16 (Abbildung 4.9C, D).

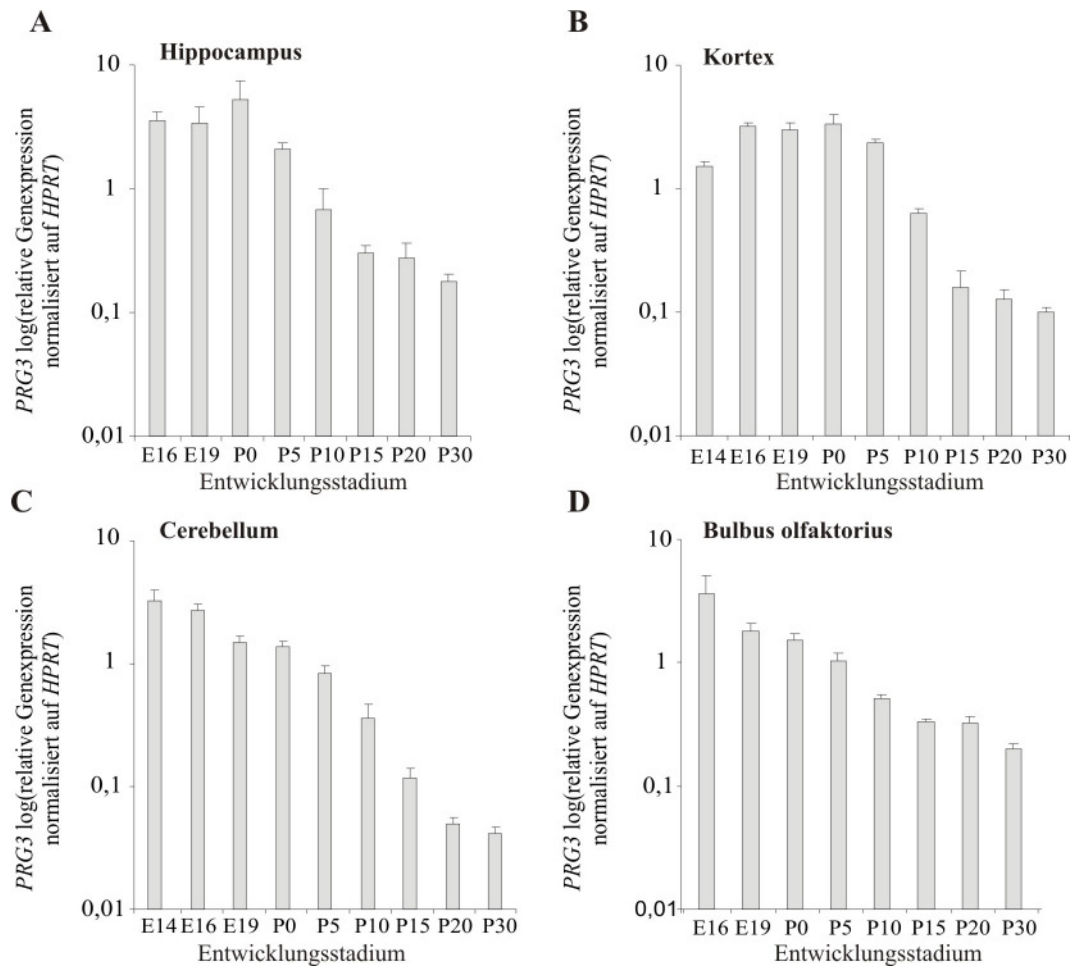


Abbildung 4.9: Entwicklungsabhängige Regulation der PRG3-mRNA-Expression in unterschiedlichen Gehirnregionen. Quantitative Real-time RT-PCR an unterschiedlichen Hirnregionen der Maus: Hippocampus (A), Kortex (B), Cerebellum (C) und Bulbus olfaktorius (D). Die PRG3-Expression in den einzelnen Regionen wurde von E14 oder E16 bis P30 analysiert. PRG3 war in allen Hirnregionen am stärksten in späten embryonalen und frühen postnatalen Stadien exprimiert. Die Ergebnisse wurden auf HPRT normalisiert. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD von $n = 3$ Experimenten. Für jedes Experiment wurde das Gewebe von mindestens drei Mäusen vereinigt.

Die entwicklungsabhängige Expression von PRG3-Protein wurde anschließend im Immunblot untersucht. Auf Proteinebene stieg die PRG3-Expression in allen untersuchten Geweben während der Embryonalentwicklung stetig an, zeigte ihr Maximum an frühen postnatalen Stadien (P5, P10) und sank danach bis P30 bzw. P60 stark ab (Abbildung 4.10). Es fiel auf, dass die maximale PRG3-Proteinexpression mit leichter zeitlicher Verzögerung im Vergleich zur maximalen PRG3-mRNA-Expression auftrat. Der Nachweis von β -Aktin diente als Ladekontrolle.

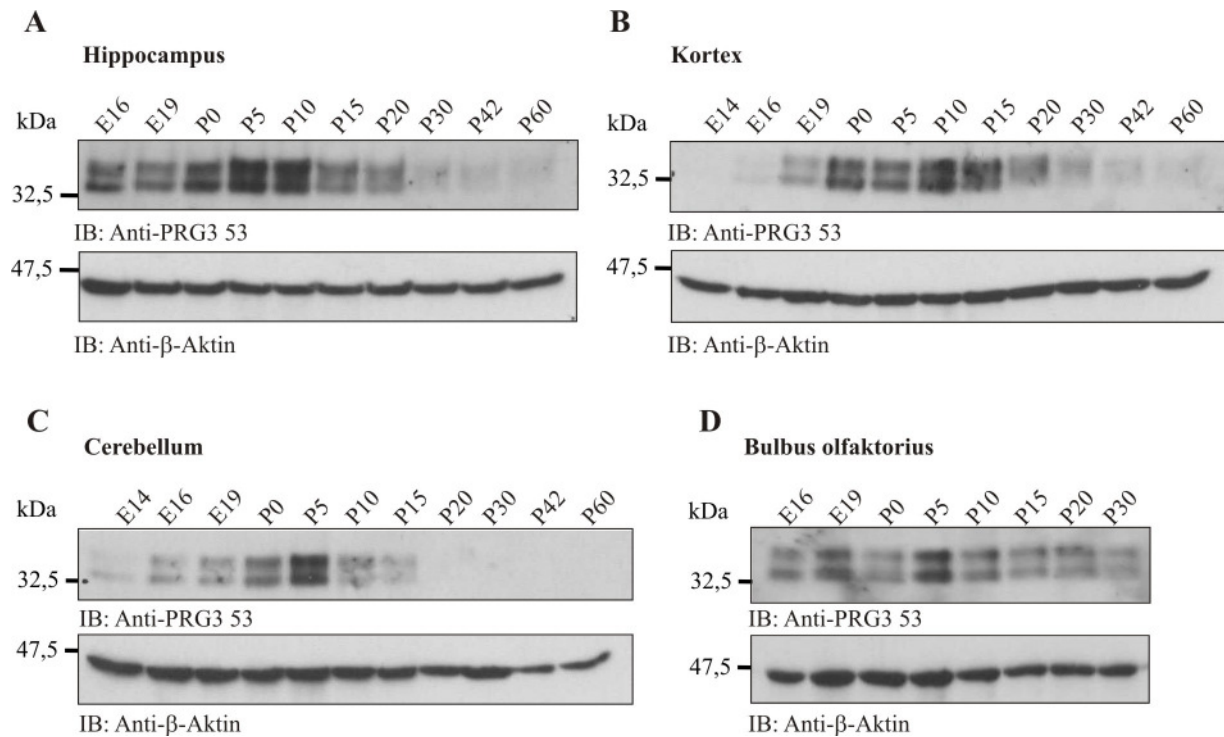


Abbildung 4.10: Entwicklungsabhängige Expression von PRG3 auf Proteinebene in unterschiedlichen Gehirnregionen. Repräsentativer Immunblot von Totalproteinlysate aus Hippocampus (A), Kortex (B), Cerebellum (C) und Bulbus olfaktorius (D) zwischen E14 (bzw. E16) und P60 (bzw. P30). Der Nachweis erfolgte mit Anti-PRG3 53. PRG3 war in allen Regionen am stärksten in frühen postnatalen Stadien exprimiert. In allen Proben wurde das Protein der jeweiligen Gehirnregion von mindestens drei Mäusen vereinigt. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von β -Aktin.

4.1.3.3 PRG3-Expression in Neuronen

Da die stärkste PRG3-Expression im Gehirn nachgewiesen wurde, sollte im Folgenden untersucht werden, welche Zelltypen dafür verantwortlich sind. Die quantitative Real-time RT-PCR ergab, dass *PRG3*-mRNA am stärksten in primären Neuronen exprimiert wurde. Die *PRG3*-Expression war dabei 20-fach stärker als in primären Astrozyten und 15-fach stärker als in primären Mikroglia (Abbildung 4.11A).

Im Immunblot konnte eine Expression von endogenem PRG3-Protein nur in primären Neuronen, nicht aber in primären Astrozyten oder Mikroglia nachgewiesen werden. Um auszuschließen, dass in den Präparationen andere als die erwarteten Zelltypen vorhanden waren, wurden im Immunblot Antikörper gegen das Neuronen-spezifische Klasse III β -Tubulin (Tuj1) als Neuronenmarker, das Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) als Astrozytenmarker und das Ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1) als Mikroglia-marker eingesetzt. Die Zellpräparationen erwiesen sich bezüglich dieser Zelltypenmarker als rein. Als Ladekontrolle diente β -Aktin (Abbildung 4.11B).

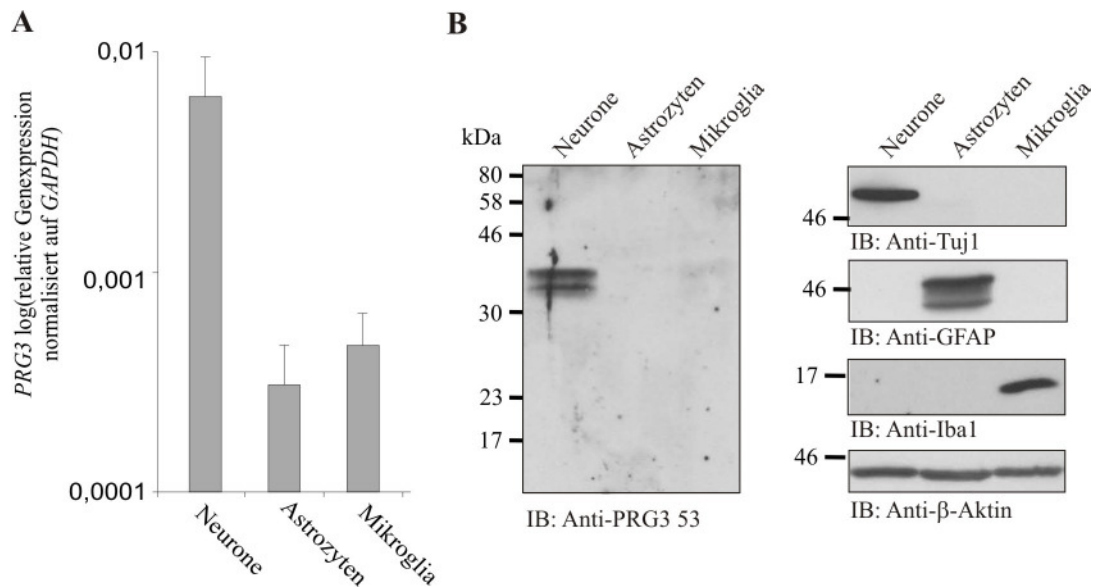


Abbildung 4.11: PRG3 wird verstärkt von primären Neuronen exprimiert. Primäre Neurone, Astrozyten und Mikroglia wurden aus embryonalen bzw. früh postnatalen Mäusen isoliert. Aus den Zellen wurden nach 12 Tagen (Neurone) bzw. 18 Tagen (Astrozyten und Mikroglia) Kulturdauer jeweils Total-RNA und Totalprotein gewonnen. **(A)** Quantitative Real-time RT-PCR zur Untersuchung der *PRG3*-mRNA-Expression in primären Neuronen, Astrozyten und Mikroglia. Die Ergebnisse wurden auf *GAPDH* normalisiert. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD von $n = 3$ Experimenten. **(B)** Repräsentativer Immunblot von Totalproteinlysate aus primären Neuronen, Astrozyten und Mikroglia. Der Nachweis erfolgte mit Anti-PRG3 53. Zur Kontrolle der Identität und Reinheit der primären Zellen wurden die folgenden zelltypenspezifischen Markerproteine nachgewiesen: Tuj1 (Neurone), GFAP (Astrozyten) und Iba1 (Mikroglia). Als Ladekontrolle wurde Anti- β -Aktin verwendet.

4.1.3.4 Endogene PRG3-Expression während der neuronalen Differenzierung

Aufgrund der weitgehend auf Neuronen beschränkten Expression von PRG3 sollte im Folgenden untersucht werden, ob die neuronale Differenzierung einen Einfluss auf die PRG3-Expression embryonaler Stammzellen *in vitro* hat. Hierzu wurde die PRG3-Expression embryonaler Mausstammzellen (mESZ) vor und nach Differenzierung in Kardiomyozyten bzw. Neurone mittels der permanenten mESZ-Linie D3 [117] untersucht. Bei Kultivierung mit dem Leukämie-inhibierenden Faktor (mLIF) verbleiben die mESZ im undifferenzierten Stadium [118], während die Differenzierung in unterschiedliche Zelltypen durch Entzug von mLIF induziert werden kann. Die Differenzierung in kontrahierende Kardiomyozyten erfolgte mittels Hanging drop-Methode [119], während die mESZ zur neuronalen Differenzierung nach mLIF-Entzug dissoziiert und in mit Gelatine beschichteten Zellkulturschalen in serumfreiem, neuronalem Kulturmedium kultiviert wurden [119, 120]. Während Kardiomyozyten schon nach 10 Tagen kontrahieren und Markerproteine wie α -Herzmuskel-Aktinin exprimieren [121], dauert die neuronale Differenzierung bis zur Expression des Neuronen-spezifischen Markerproteins Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (MAP2) ca. 16 Tage [119]. Die undifferenzierten mESZ sowie aus diesen Zellen differenzierte

Kardiomyozyten und Neurone nach unterschiedlich langer Differenzierungsdauer wurden von einer kooperierenden Arbeitsgruppe (AG Seiler, Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin) zur Verfügung gestellt.

Mittels quantitativer Real-time RT-PCR konnte in den undifferenzierten mESZ-Zellen kaum *PRG3*-mRNA detektiert werden. Durch die Ausdifferenzierung der mESZ in kontrahierende Kardiomyozyten veränderte sich das *PRG3*-Niveau nicht (Abbildung 4.12). Wurden die undifferenzierten mESZ im Gegensatz dazu jedoch in Neurone differenziert, war die *PRG3*-Expression nach 12 Tagen schon um das 60-fache im Vergleich zu der in undifferenzierten Zellen erhöht. Die *PRG3*-Expression nahm auch nach Tag 12 weiter zu und stieg nach 21 Tagen auf das ca. 100-fache im Vergleich zu undifferenzierten mESZ (Abbildung 4.12). Zur Kontrolle der neuronalen Differenzierung der mESZ wurde die Expression des neuronalen Markers *tuj1* bestimmt (Abbildung 4.12). In diesem Experiment wurden alle üblicherweise verwendeten Standardgene (*HPRT*, *GAPDH*, β -Aktin) reguliert. Deshalb wurde hier als Standardgen der *Eukaryotische Translations-Initiations-Faktor 1a* (*Eif1a*) verwendet.

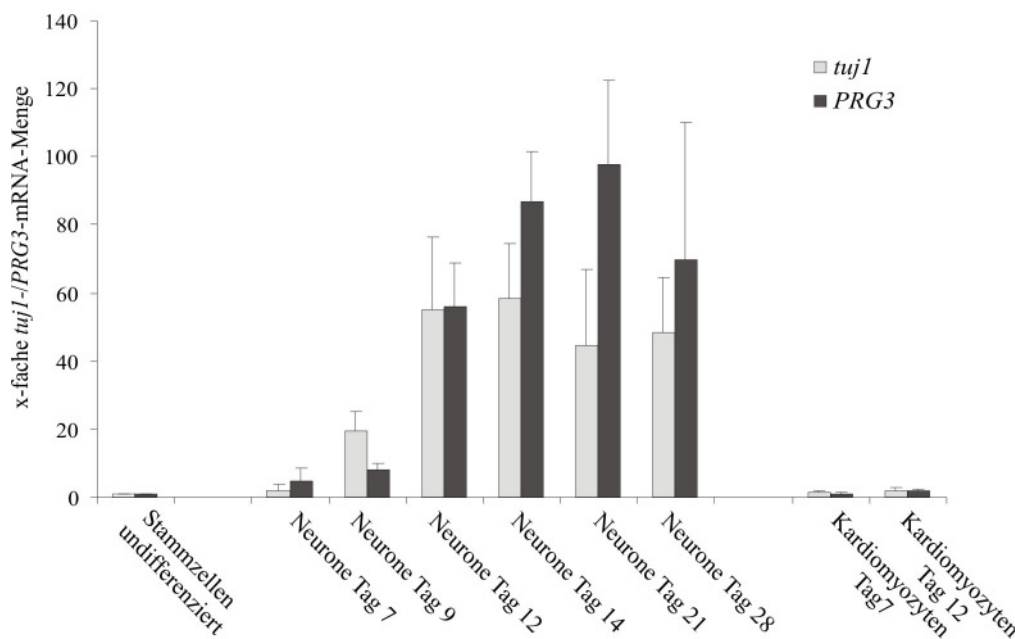


Abbildung 4.12: Relatives Transkriptionsniveau von *PRG3* in der mESZ-Zelllinie D3 vor und nach Differenzierung in Neurone bzw. Kardiomyozyten. Maus-ESZ wurden nach Entzug von mLIF mittels Hanging drop-Methode in Kardiomyozyten oder in mit Gelatine beschichteten Kulturgefäßen in neuronalem Kulturmedium in Neurone differenziert. Die *PRG3*-mRNA-Expression wurde mittels quantitativer Real-time RT-PCR ermittelt und auf *Eif1a* normalisiert. Zur Kontrolle der neuronalen Differenzierung wurde *tuj1* als Marker verwendet. Die *PRG3*- und *tuj1*-Expression der undifferenzierten mESZ wurde jeweils auf 1 gesetzt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD von $n = 3$ Experimenten.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass *PRG3* weitgehend gehirnspezifisch und hier hauptsächlich von Neuronen exprimiert wird.

Dabei zeigt sich die stärkste Expression in späten embryonalen und frühen postnatalen Stadien. Des Weiteren scheint PRG3 während der neuronalen Differenzierung von embryonalen Stammzellen *in vitro* eine Rolle zu spielen.

4.1.4 Intrazelluläre Lokalisation von PRG3 in Neuronen

Bisher wurde die intrazelluläre Lokalisation von PRG3 mittels Überexpression von PRG3-Fusionsproteinen in Zelllinien bestimmt. Das Fusionsprotein GFP-PRG3 ist in N1E-115-, Cos7- und HeLa-Zellen sowohl in der Plasmamembran als auch in intrazellulären Membranstrukturen (wahrscheinlich endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Komplex) lokalisiert [103, 107]. In dieser Arbeit konnte die stärkste endogene PRG3-Expression im Gehirn und hier insbesondere in Neuronen nachgewiesen werden. Da es sich bei Neuronen um hoch polarisierte Zellen mit einem Axon und mehreren oft stark verzweigten Dendriten handelt, sollte die intrazelluläre Verteilung von PRG3-Protein in dieser Arbeit in primären hippocampalen Neuronen der Maus nach unterschiedlicher Kulturdauer *in vitro* untersucht werden. Primäre dissoziierte Neuronenkulturen sind ein gut etabliertes Modellsystem, um neuronale Polarität und Differenzierung zu untersuchen [10, 11]. Die hierbei ablaufenden morphologischen Veränderungen können in fünf Stadien unterteilt werden, die in Kapitel 1.1.2 detailliert beschrieben wurden.

4.1.4.1 Intrazelluläre Lokalisation von GFP-mPRG3 in primären Neuronen

Zur intrazellulären Lokalisation von PRG3 wurden zunächst primäre Neurone drei Stunden nach dem Ausplattieren mit einem GFP-mPRG3-Expressionsplasmid transfiziert und zwei Tage später mit Anti-GFP und einem Antikörper gegen das neuronale Markerprotein MAP2 gefärbt. GFP-mPRG3 war in intrazellulären Kompartimenten und der gesamten Plasmamembran lokalisiert. Die Ausbildung von Filopodien auf der Zelloberfläche wie sie u.a. in HEK293-, N1E-115- oder Cos7-Zellen nach Transfektion mit PRG3-Fusionsproteinen auftritt (siehe Kapitel 4.1.2.2), war in primären Neuronen unter diesen Versuchsbedingungen nicht zu beobachten (Abbildung 4.13).

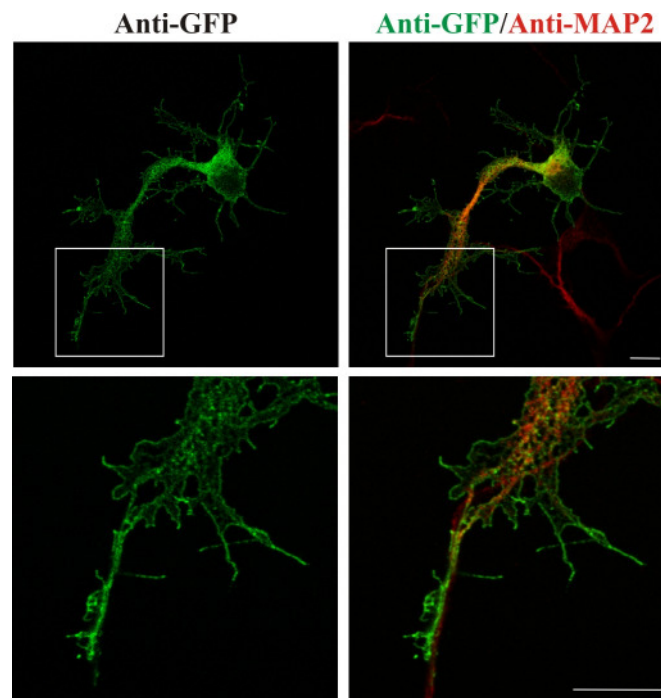


Abbildung 4.13: GFP-mPRG3 wird in der Plasmamembran von primären Neuronen exprimiert. Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen primärer Neurone, die drei Stunden nach dem Ausplattieren mit GFP-mPRG3 transfiziert wurden. Die Analyse erfolgte nach zwei Tagen in Kultur. Die Neurone wurden zur Verstärkung des GFP-Signals immunzytochemisch mit Anti-GFP gefärbt. Der Nachweis der neuronalen Identität der Zellen erfolgte mittels Anti-MAP2. Oben: Übersicht, unten: Vergrößerung des markierten Bereichs, Balken 10 µm.

Zur genaueren Eingrenzung der intrazellulären PRG3-Lokalisation, wurden primäre hippocampale Neurone nach 1 und 4 bzw. 14 Tagen *in vitro* fixiert, endogenes PRG3 immunzytochemisch gefärbt und mit Markerproteinen für Zellstrukturen kolokalisiert.

4.1.4.2 Intrazelluläre PRG3-Lokalisation in frühen primären Neuronen

Primäre hippocampale Neurone wurden nach 1 bzw. 4 Tagen *in vitro* fixiert und endogenes PRG3 immunzytochemisch nachgewiesen. Das Aktin- und Tubulinzytoskelett der Neurone wurde mit Anti- β -Aktin- bzw. Anti- α -Tubulin dargestellt, um eine eventuelle Kolokalisation von PRG3 mit Proteinen des Zytoskeletts zu untersuchen. Dabei wurde die Negativkontrolle ohne Primärantikörper in Abbildung 4.14 exemplarisch dargestellt.

Die Mehrzahl der primären Neurone besaß nach einem Tag in Kultur mehrere α -Tubulin-positive Ausläufer gleicher Länge (Stadium 2; Abbildung 4.14A). In den meisten Neuronen waren diese Ausläufer noch undifferenziert. Endogenes PRG3 war vor allem in der Plasmamembran lokalisiert. Es fiel auf, dass PRG3 in der Plasmamembran aller Neuriten enthalten war, die sich nach einem Tag *in vitro* ausgebildet hatten. Das Zytoskelettprotein β -Aktin war hauptsächlich in Lamellipodien und Wachstumskegeln der Neuriten lokalisiert. Die endogene PRG3-Expression war in der Plasmamembran von Wachstumskegeln besonders schwach,

wenn diese stark β -Aktin-positiv waren. Eine besonders starke PRG3-Expression konnte in der Plasmamembran des Neuritenschafts beobachtet werden (Abbildung 4.14B).

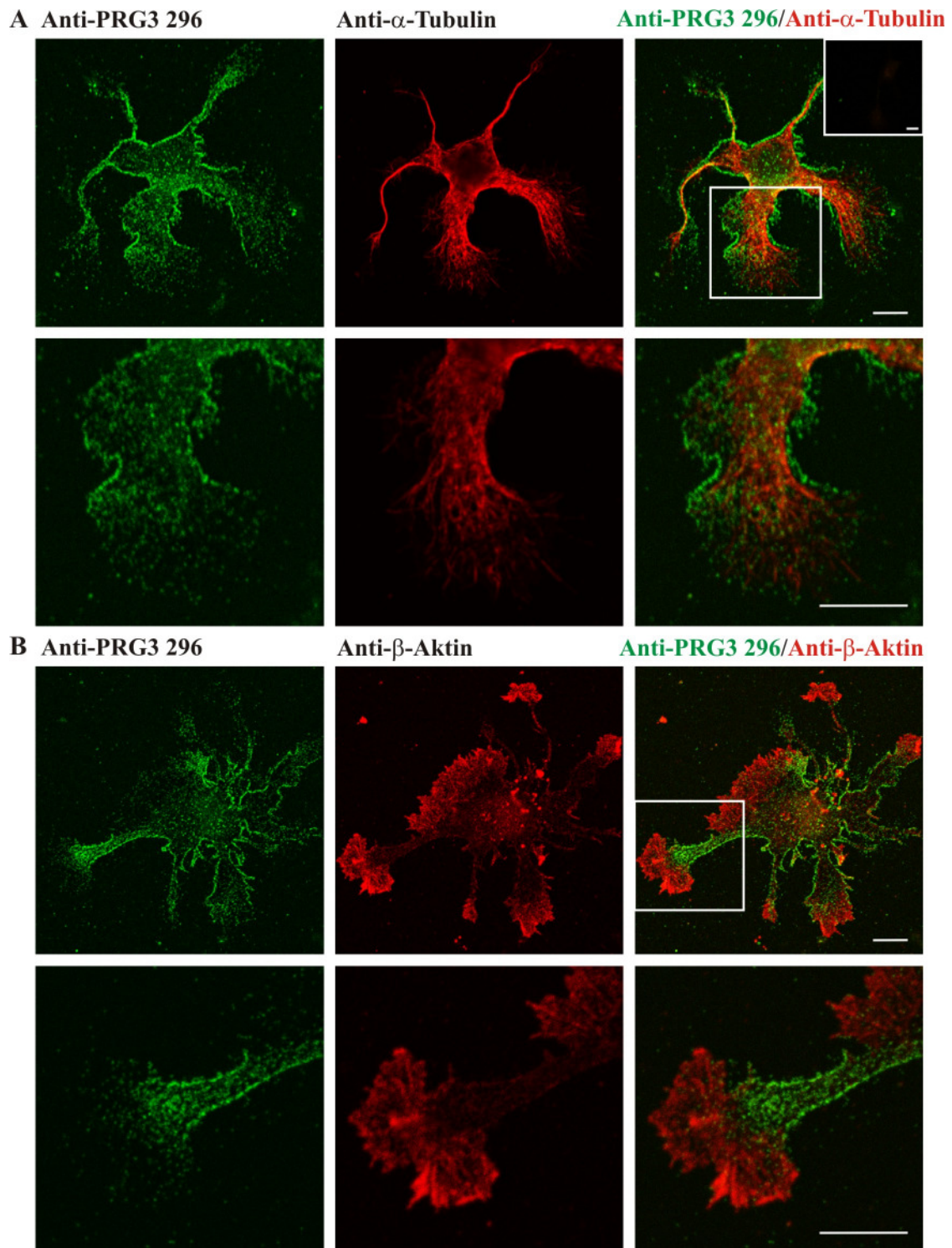


Abbildung 4.14: PRG3 ist in der Plasmamembran primärer Neurone nach einem Tag *in vitro* lokalisiert. Primäre hippocampale Neurone wurden nach einem Tag in Kultur analysiert und repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen angefertigt. (A) Immunzytochemische Färbung mit Anti-PRG3 296 und Anti- α -Tubulin. Oben: Übersicht, unten: Vergrößerung des markierten Bereichs. Beispielhaft wurde oben rechts eine Kontrollfärbung ohne Primärantikörper dargestellt. (B) Immunzytochemische Färbung mittels Anti-PRG3 296 und Anti- β -Aktin. Oben: Übersicht, unten: Vergrößerung des markierten Bereichs, Balken 10 μm .

Nach vier Tagen *in vitro* waren die Ausläufer der primären hippocampalen Neurone in Axone und Dendriten differenziert (Stadium 4). Endogenes PRG3 war in diesen Zellen in Neuriten und Wachstumskegeln zu finden. In diesen Kulturen war ebenfalls zu beobachten, dass PRG3 vermehrt im Neuritenschaft lokalisiert war (Abbildung 4.15). In Wachstumskegeln war PRG3 nur an Stellen lokalisiert, an denen kein oder nur wenig β -Aktin vorhanden war (Abbildung 4.15B).

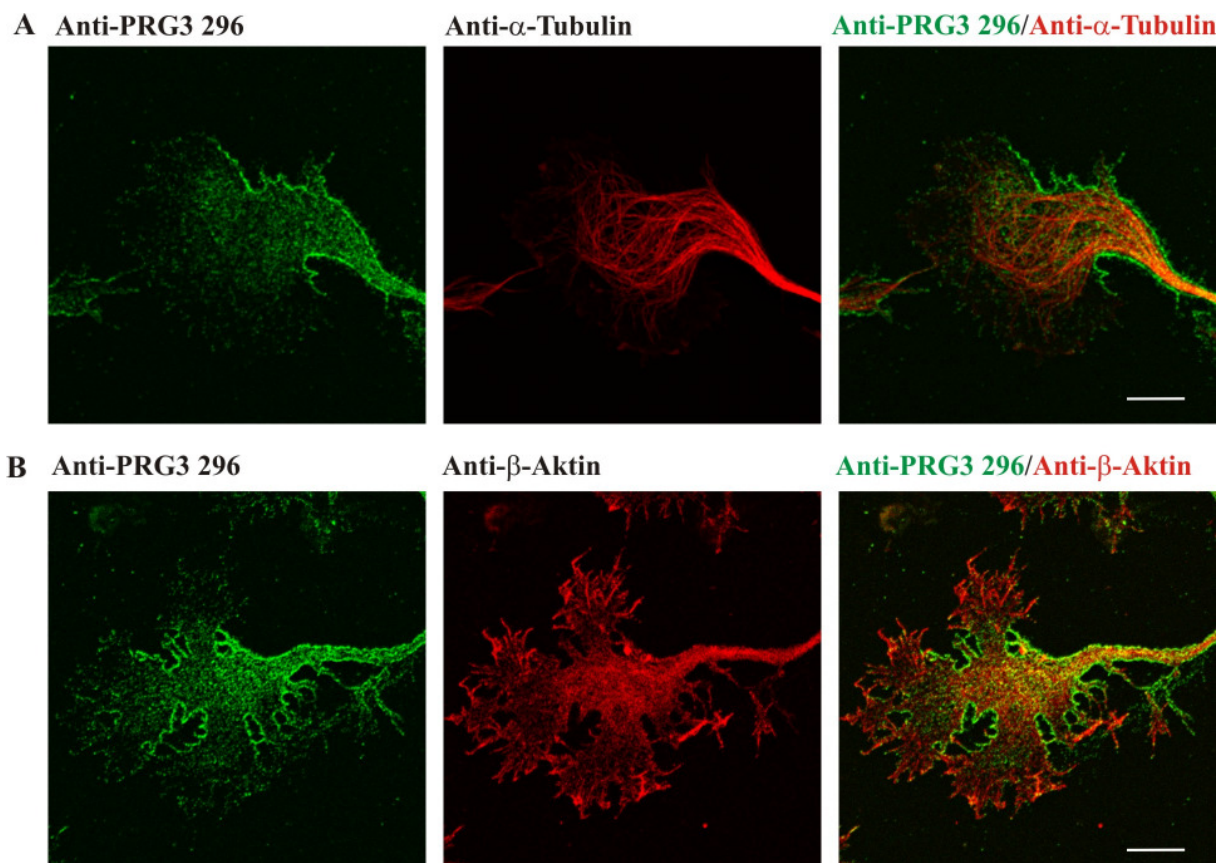


Abbildung 4.15: Lokalisation von endogenem PRG3 in Wachstumskegeln primärer Neurone nach vier Tagen *in vitro*. Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen primärer hippocampaler Neurone nach vier Tagen in Kultur. Immunzytochemische Färbung mit Anti-PRG3 296 und Anti- α -Tubulin (A) bzw. Anti- β -Aktin (B). Balken: 10 μ m.

Zur Unterscheidung von Axon und Dendriten wurden die primären hippocampalen Neurone mit Anti-MAP2 als Dendritenmarker und Anti-Tau1 als Axonmarker angefärbt. Tau1 ist ein axonal lokalisiertes Protein, das eine wichtige Rolle bei der Mikrotubulianordnung spielt. Nach vier Tagen *in vitro* war endogenes PRG3 sowohl in der Plasmamembran Tau1-positiver Axone als auch MAP2-positiver Dendriten lokalisiert (Abbildung 4.16).

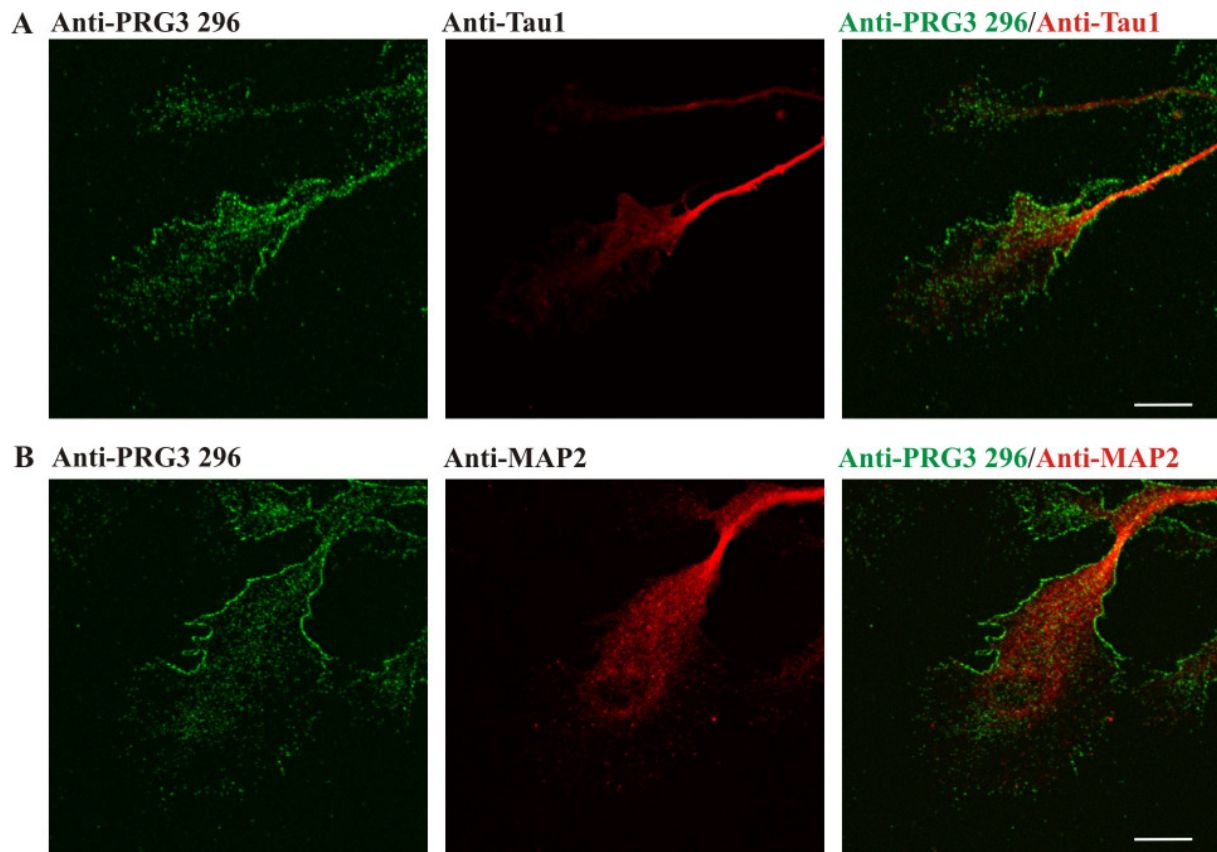


Abbildung 4.16: Axonale und dendritische Lokalisation von PRG3 in primären hippocampalen Neuronen nach vier Tagen *in vitro*. Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen der immunzytochemischen Färbung von Wachstumskegeln und Neuriten primärer hippocampaler Neurone nach vier Tagen *in vitro* mit Anti-PRG3 296 und Anti-Tau1 als axonalem Marker (A) bzw. Anti-MAP2 als Dendritenmarker (B). Balken: 10 µm.

4.1.4.3 Intrazelluläre PRG3-Lokalisation in reifen primären Neuronen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass PRG3 nach vier Tagen *in vitro* sowohl im Axon als auch in Dendriten hippocampaler Neurone lokalisiert war, wurde die intrazelluläre Verteilung in Neuronen nach 14 Tagen in Kultur untersucht. Zu diesem Zeitpunkt sind Axon und Dendriten ausgereift und haben funktionelle Synapsen ausgebildet (Stadium 5) [5, 7]. Im Unterschied zu frühen hippocampalen Neuronen war PRG3 in reifen Neuronen nach 14 Tagen in Kultur kaum in Dendriten detektierbar wie die Koloration von PRG3 mit MAP2 zeigt (Abbildung 4.17A). Im Gegensatz dazu war PRG3 deutlich mit dem axonalen Marker Tau1 kolokalisierbar. PRG3 war in Form eines gepunkteten Signals entlang der Axone zu erkennen (Abbildung 4.17B).

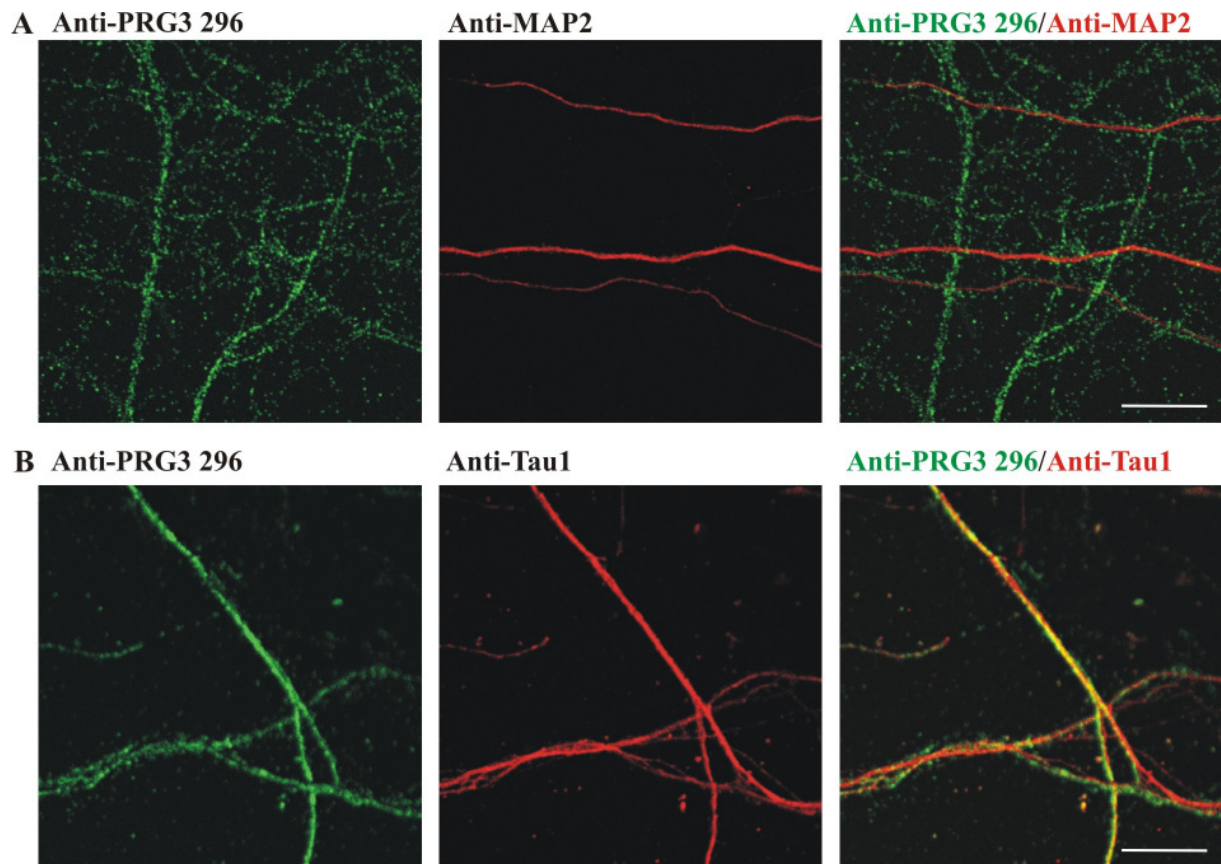


Abbildung 4.17: In reifen primären Neuronen nach 14 Tagen Kulturdauer wird PRG3 hauptsächlich in Axonen exprimiert. Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen reifer primärer hippocampaler Neurone nach 14 Tagen in Kultur. Kolokalisation von Anti-PRG3 296 und Anti-MAP2 (A) bzw. Anti-Tau1 (B). Balken: 10 µm.

Zur Untersuchung, ob PRG3 in präsynaptischen Strukturen reifer hippocampaler Neurone lokalisiert ist, wurden immunzytochemische Färbungen mit Anti-PRG3 und Anti-Synaptobrevin2 bzw. Anti-Synaptophysin1 durchgeführt. Synaptobrevin2 und Synaptophysin1 sind integrale Membranproteine in sekretorischen Vesikeln der Präsynapse. PRG3 war in diesen Färbungen sowohl in den Synaptobrevin2- bzw. Synaptophysin1-positiven Synapsen als auch außerhalb dieser Synapsen lokalisiert (Abbildung 4.18A/B).

Postsynaptisch war PRG3 im Gegensatz dazu nicht nachweisbar, da keine Kolokalisation mit dem postsynaptischen Markerprotein Post synaptic density 95 (PSD95) zu erkennen war (Abbildung 4.18C). Da Präsynapsen auf dem Axon und Postsynapsen auf den Dendriten lokalisiert sind, ist dieses Ergebnis ein weiterer Hinweis auf eine weitgehend axonale Expression von PRG3 in reifen hippocampalen Neuronen.

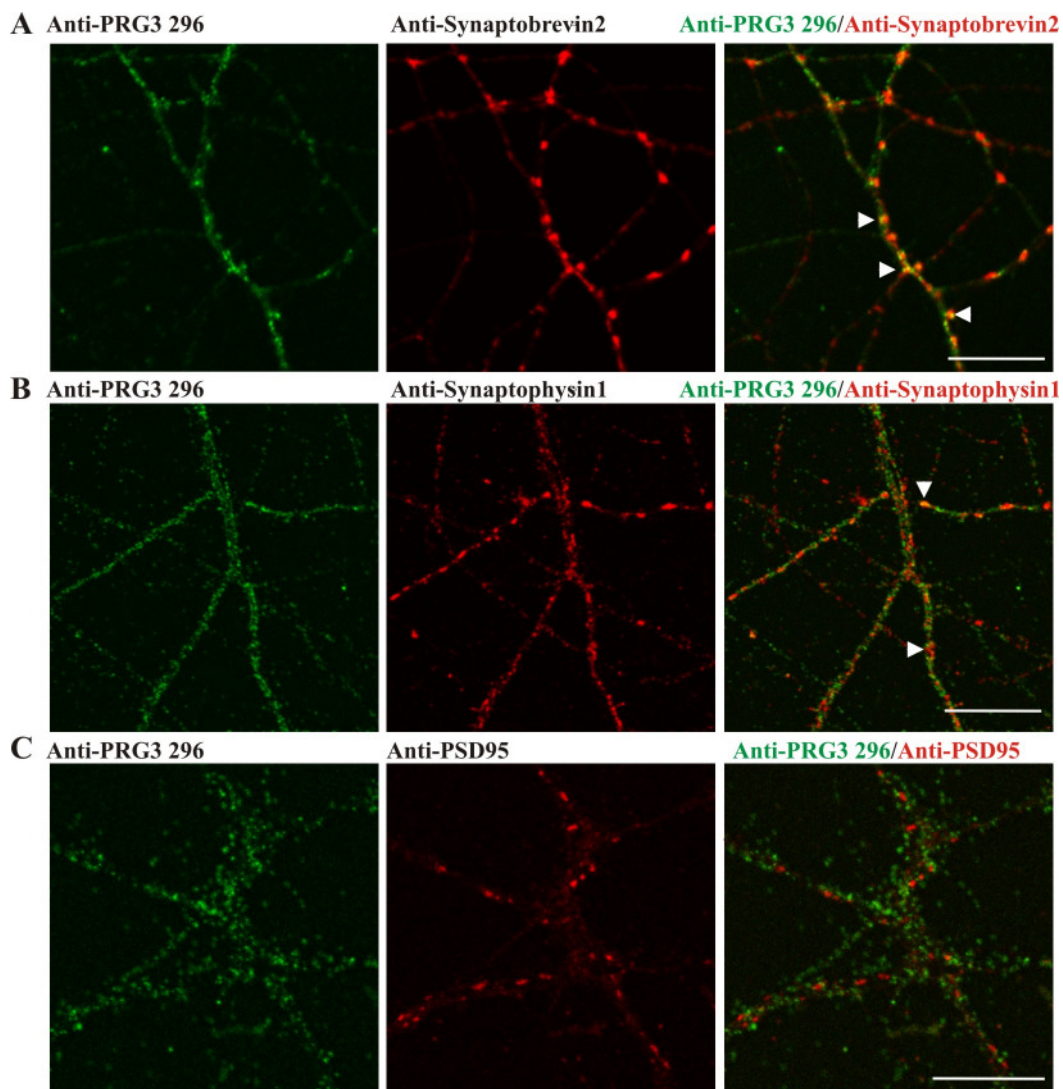


Abbildung 4.18: PRG3 ist in primären Neuronen nach 14 Tagen Kulturdauer in präsynaptischen Strukturen lokalisiert. Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen reifer primärer hippocampaler Neurone. Die Neurone wurden immunzytochemisch mit Anti-PRG3 296 und Anti-Synaptobrevin2 (**A**), Anti-Synaptophysin1 (**B**) bzw. Anti-PSD95 (**C**) gefärbt. Pfeilspitzen markieren beispielhaft Stellen, an denen die präsynaptischen Markerproteine mit PRG3 kolokalisiert waren. Balken: 10 µm.

Um festzustellen, ob es sich bei den präsynaptischen Strukturen mit PRG3-Expression um glutamaterge oder GABAerge Synapsen handelte, wurde eine immunzytochemische Neuronenfärbung mit Antikörpern gegen den Vesikulären Glutamat-Transporter1 (VGLUT1) bzw. den Vesikulären GABA-Transporter1 (VGAT1) durchgeführt. VGAT1 ist ein Marker für inhibitorische GABAerge Synapsen, während VGLUT1 ein Markerprotein für exzitatorische glutamaterge Synapsen ist. PRG3 war in beiden Synapsenarten zu finden (Abbildung 4.19).

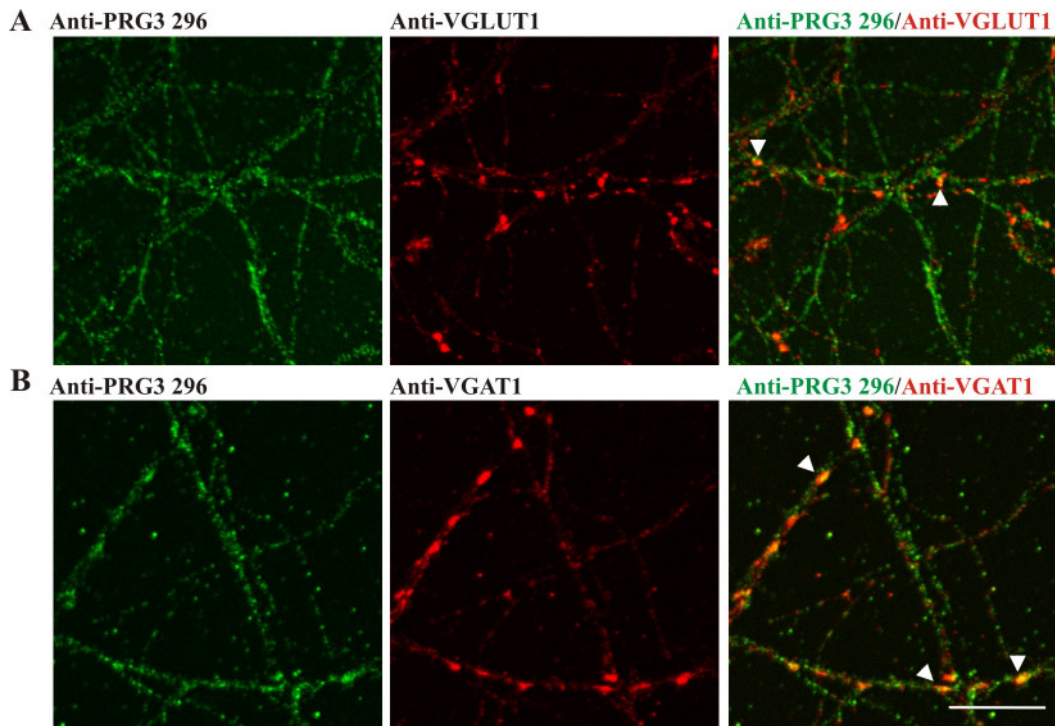


Abbildung 4.19: PRG3 wird sowohl von glutamatergen als auch von GABAergen Synapsen hippocampaler Neurone nach 14 Tagen Kulturdauer exprimiert. Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen primärer hippocampaler Neurone nach 14 Tagen *in vitro*. Die Neurone wurden immunzytochemisch mit Anti-PRG3 296 und Anti-VGLUT1 (A) bzw. Anti-VGAT1 (B) gefärbt. Pfeilspitzen markieren Stellen, an denen PRG3 und VGLUT1 bzw. VGAT1 kolokalisiert waren. Balken: 10 µm.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass PRG3 in frühen unreifen Neuronen *in vitro* vor allem in der Plasmamembran sämtlicher Ausläufer lokalisiert ist. Die stärkste Expression tritt dabei in der Plasmamembran des Neuritenschafts auf. In reifen Neuronen wird PRG3 weitgehend axonal exprimiert und kommt hier unter anderem in präsynaptischen Strukturen vor.

4.2 Untersuchungen zu LPP1 und -1a

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Expression und Funktion von LPP1 und der Spleißvariante LPP1a untersucht werden. Hierbei handelt es sich wie bei PRG3 um Mitglieder der LPT-Familie. LPP1 und -1a wurden bisher ausführlich im Hinblick auf ihre enzymatischen Eigenschaften untersucht [79, 80, 84]. Die Expression und Funktion von LPP1 und -1a im ZNS sind aber noch weitgehend unbekannt. Da bekannt ist, dass LPA während der Entwicklung des Gehirns eine wichtige Rolle spielt (Details siehe Kapitel 1.3.1), könnten auch die LPA-degradierenden LPPs an diesen Prozessen beteiligt sein.

4.2.1 Aufreinigung und Spezifitätstest polyklonaler Antikörper gegen LPP1 und -1a

Da es bisher keine kommerziellen Antikörper gegen LPP1 und/oder -1a gibt, sollten im Rahmen dieser Arbeit zunächst Antikörper gegen LPP1 und/oder -1a aufgereinigt und charakterisiert werden.

4.2.1.1 Herstellung von Immunsereen

Zur Herstellung polyklonaler Antikörper gegen LPP1 und/oder -1a wurden von der Firma BioGenes Kaninchen mit unterschiedlichen Peptiden immunisiert. Hierzu wurden sowohl Peptide aus der ersten extrazellulären Schleife gewählt, in deren Proteinsequenz sich die Spleißvarianten LPP1 und -1a unterscheiden (Aminosäuren 41 – 54 von mLPP1 und 42 – 55 von mLPP1a), als auch ein Peptid, dessen Sequenz sich im intrazellulären C-Terminus von LPP1 und -1a befindet (Aminosäuren 252 - 265 von mLPP1 bzw. Aminosäure 253 – 266 von mLPP1a). Dort haben beide Spleißvarianten dieselbe Aminosäuresequenz, sodass ein Antikörper gegen dieses Peptid beide Spleißvarianten erkennen sollte (Abbildung 4.20).

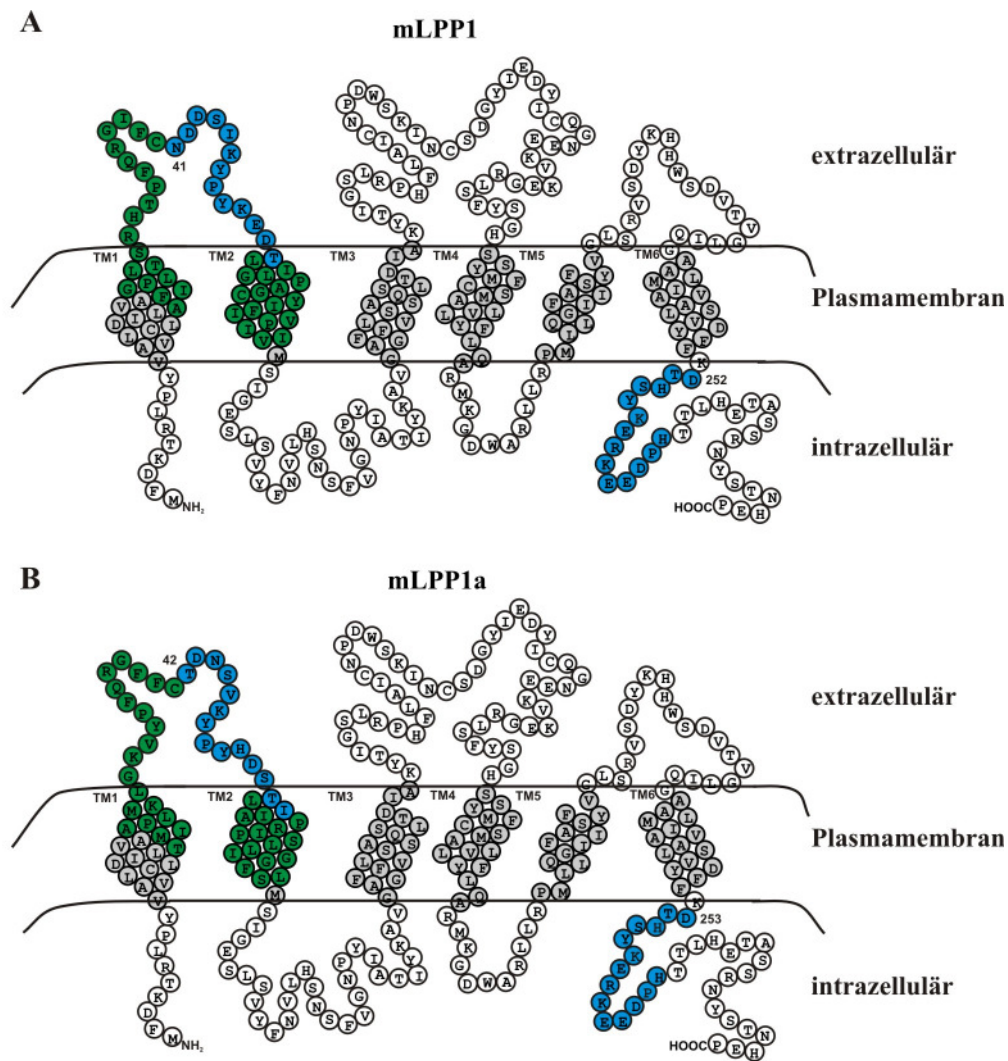


Abbildung 4.20: Kugelmodelle von mLPP1 und -1a. mLPP1 (**A**), mLPP1a (**B**). Blau markiert sind die Aminosäuren der Peptide, mit denen die Kaninchen zur Herstellung der Antikörper immunisiert wurden. Die Proteinsequenz, in der sich LPP1 und -1a unterscheiden, wurde grün markiert. Modifiziert nach [96].

4.2.1.2 Auswahl und Affinitätsaufreinigung der LPP1- und -1a-Antikörper

Die Kaninchenserum wurden im Immunblot auf ihre Spezifität gegenüber rekombinantem aufgereinigtem GFP-mLPP1 und -1a getestet. Das Molekulargewicht beider Proteine beträgt ca. 59 kDa (berechnet mit dem ExPASy Compute pI/MW tool). Im Immunblot zeigten sich die Proteine als Doppelbande bei 58 - 61 kDa. Diese Doppelbande ist auf eine Glykosylierung von LPP1 und -1a an der zweiten extrazellulären Schleife zurückzuführen [96, 111, 122]. Das Serum eines Kaninchens, das mit dem mLPP1-spezifischen Peptid immunisiert wurde, detektierte nur rekombinantes GFP-mLPP1, nicht aber GFP-mLPP1a. Ein weiteres Serum aus einem Kaninchen, das mit dem mLPP1a-spezifischen Peptid immunisiert wurde, identifizierte nur rekombinantes GFP-mLPP1a, nicht aber GFP-mLPP1. Im Gegensatz dazu detektierte das Serum eines Kaninchens, welches mit dem Peptid aus dem C-Terminus von mLPP1 und -1a

immunisiert wurde, beide Spleißvarianten. Neben den erwünschten Signalen für GFP-mLPP1 und/oder GFP-mLPP1a führten die in den Seren enthaltenen Antikörper im Immunblot zu unspezifischen Proteinbanden und Hintergrundfärbung. Zur Reduzierung des starken Hintergrundsignals wurden die Antiseren mittels Affinitätschromatographie gegen das entsprechende Peptid aufgereinigt. Anschließend wurde das Eluat erneut im Immunblot auf seine Spezifität gegenüber rekombinatem aufgereinigtem GFP-mLPP1 und -1a getestet. Die Aufreinigung hatte das starke Hintergrundsignal deutlich reduziert. Der LPP1/1a-Antikörper erkannte beide Spleißvarianten im Immunblot, während mit den LPP1- bzw. -1a-Antikörpern eine spezifische Detektion jeweils nur einer Spleißvariante möglich war (Abbildung 4.21).

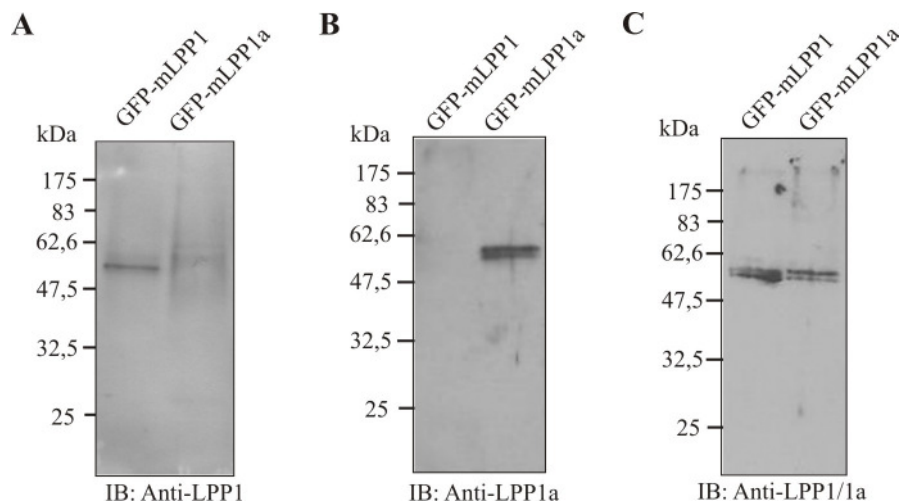


Abbildung 4.21: LPP1- und/oder -1a-spezifische Antikörper im Immunblot nach Affinitätsaufreinigung. Anti-LPP1 (A), Anti-LPP1a (B) und Anti-LPP1/1a (C) wurden nach Affinitätsaufreinigung im Immunblot an rekombinatem aufgereinigtem GFP-mLPP1 und -1a auf ihre Spezifität getestet. Die Antikörper ermöglichen eine Detektion der einzelnen bzw. beider LPP-Spleißvarianten zusammen.

4.2.1.3 Spezifität der aufgereinigten LPP1- und -1a-Antikörper

Zur weiteren Charakterisierung der Antikörper wurde ein Test mit blockierendem Peptid analog des Spezifitätstests von Anti-PRG3 (Kapitel 4.1.1.2) durchgeführt. Die Zugabe des blockierenden Peptids zur Antikörperverdünnung führte bei allen drei Antikörpern zur Unterdrückung des spezifischen Proteinsignals im Immunblot, während die Inkubation mit BSA keinen Einfluss auf das Ergebnis hatte (Abbildung 4.22). Das ist ein Hinweis auf die Spezifität der hergestellten Antikörper (Abbildung 4.22).

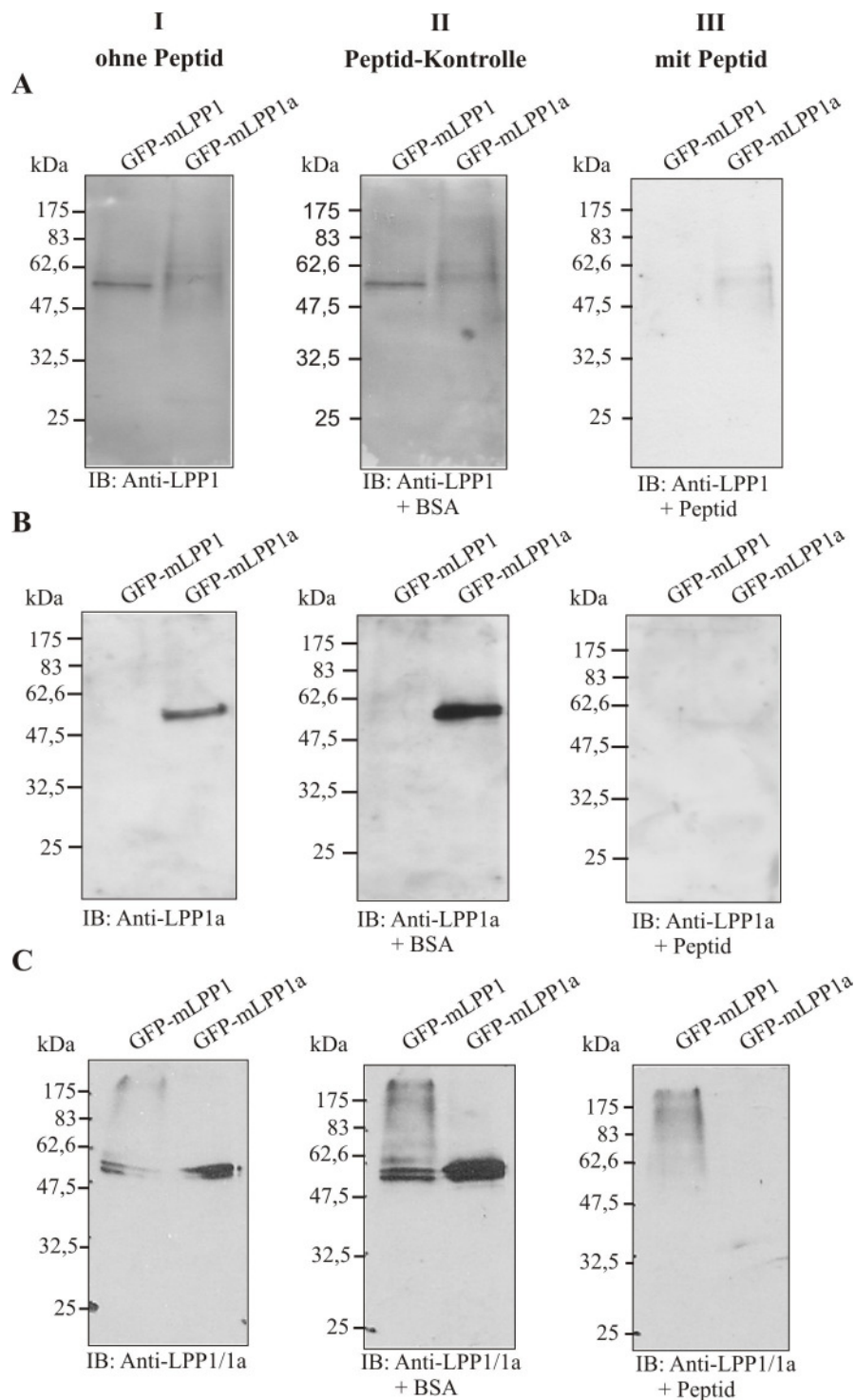


Abbildung 4.22: Spezifitätstest von Anti-LPP1, Anti-LPP1a und Anti-LPP1/1a mittels blockierendem Peptid. Die Antikörper wurden mit dem immunisierenden Peptid vorinkubiert und danach auf eine Membran mit GFP-mLPP1- und -1a-Protein gegeben (III). Als Kontrolle wurde jeweils eine reine Antikörperverdünnung (I) oder eine mit BSA vorinkubierte Antikörperverdünnung (II) verwendet. Anti-LPP1 (A), Anti-LPP1a (B), Anti-LPP1/1a (C).

Da die Antikörper zur Detektion von endogenem LPP1 und -1a in Geweben eingesetzt werden sollten, wurden sie zusätzlich an Proteinlysaten aus Gehirn-, Herz- und Lungengewebe von Wildtypmäusen getestet. Als Positivkontrolle für die LPP1-Expression

diente Proteinlysate aus Geweben transgener LPP1-Mäuse. Diese exprimieren vermehrt LPP1, da sie mehrere *LPP1*-Kopien unter einem β -Aktin-Promotor in ihr Genom integriert haben [99].

Mit dem LPP1/1a-Antikörper konnten im Proteinlysate aller drei Gewebe der transgenen Maus starke Banden auf der Höhe von 32 bis 35 kDa detektiert werden. Im Gegensatz dazu waren diese Banden im Proteinlysate von Wildtypmäusen nur sehr schwach zu erkennen (Abbildung 4.23C). Im Gegensatz zum LPP1/1a-Antikörper zeigte der LPP1-Antikörper keine Banden, die in den Geweben der LPP1-transgenen-Maus im Vergleich zur Wildtypmaus verstärkt waren (Abbildung 4.23A). Der LPP1-Antikörper ist also nicht zur Detektion von endogenem LPP1 geeignet. Da diese Mauslinie nur LPP1, nicht aber LPP1a als Transgen trägt, zeigte sich mit dem LPP1a-Antikörper wie erwartet kein Unterschied im Bandenmuster zwischen Wildtyp- und LPP1-transgenen-Mäusen. Allerdings war auch kein endogenes LPP1a in den Geweben bei ca. 32 kDa zu erkennen (Abbildung 4.23B).

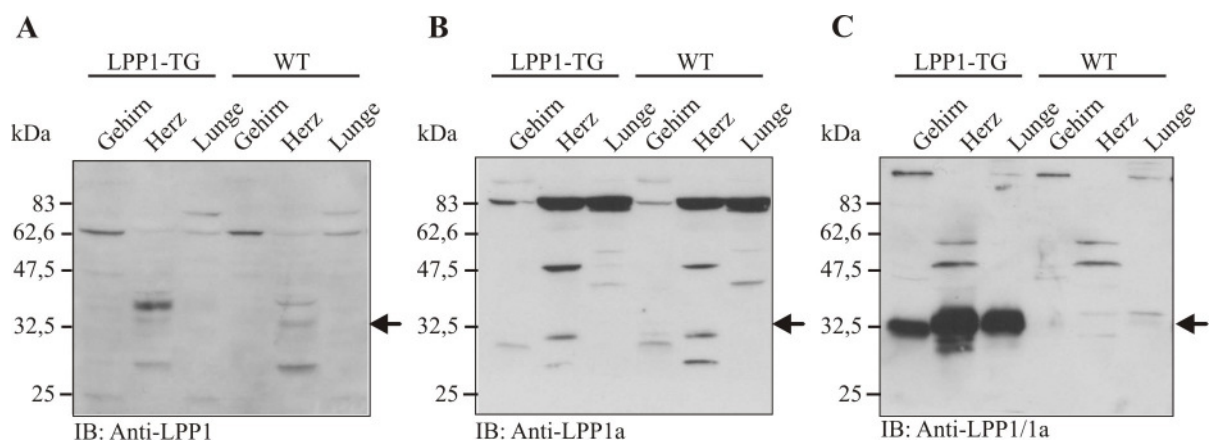


Abbildung 4.23: Spezifitätstest der affinitätsgereinigten LPP-Antikörper an Proteinlysaten aus Geweben von LPP1-transgenen und Wildtypmäusen. Immunblot von Proteinlysaten aus Gehirngewebe, Herz- und Lungengewebe einer LPP1-transgenen (LPP1-TG) und einer Wildtypmaus (WT). Der Nachweis erfolgte mit Anti-LPP1 (A), Anti-LPP1a (B) und Anti-LPP1/1a (C). Pfeile markieren bei 32 – 35 kDa die Höhe im Immunblot, auf der die LPP1- und -1a-spezifischen Signale zu erwarten waren.

Da der LPP1-spezifische Antikörper als zur Detektion von endogenem LPP1 im Immunblot ungeeignet erschien und der LPP1a-Antikörper ebenfalls nicht in der Lage war, endogenes LPP1a zu detektieren, wurde im Folgenden ausschließlich der LPP1/1a-Antikörper eingesetzt. Beide Spleißvarianten besitzen aber ein fast identisches Molekulargewicht, weshalb keine Spleißvarianten-spezifische Proteindetektion möglich war. Da der C-Terminus zwischen LPP1 bzw. -1a und LPP2 bzw. LPP3 nicht konserviert ist, ist keine Kreuzreaktivität des LPP1/1a-Antikörpers mit LPP2- oder LPP3-Protein zu erwarten.

Aus obigen Experimenten lässt sich schlussfolgern, dass der ausgewählte LPP1/1a-Antikörper eine spezifische, gemeinsame Detektion von LPP1 und -1a im Immunblot ermöglicht.

4.2.2 Einfluss von LPP1 und -1a auf die Morphologie von N1E-115-Zellen

Mit Hilfe der Neuroblastomzelllinie N1E-115 sollte der Einfluss von LPP1 und -1a auf die Morphologie neuronaler Zellen untersucht werden. Neuroblastomzellen sind undifferenzierte Zellen, die sich von der Neuralleiste ableiten [123]. Sie werden üblicherweise als Modellsystem zur Untersuchung von Auswachs- und Retraktionsprozessen von Neuriten verwendet [74, 124-126]. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von LPP1 und -1a auf die Morphologie von N1E-115-Zellen zum einen durch Überexpression und zum anderen durch Knockdown mit LPP1- und/oder -1a-spezifischen short hairpin RNAs (shRNA) untersucht.

4.2.2.1 Überexpression von GFP-LPP1 oder -1a in N1E-115-Zellen

Um den Einfluss von LPP1 bzw. -1a auf die Morphologie von N1E-115-Zellen zu untersuchen, wurden diese mit Plasmiden transfiziert, die entweder für GFP-mLPP1 oder -1a kodierten. Als Kontrolle wurden Zellen mit dem Leervektor transfiziert, der alleine für GFP kodiert. Zwei Tage nach Transfektion wurde das serumhaltige Zellkulturmedium gegen serumfreies ausgetauscht. Serumentzug führt in N1E-115-Zellen zur Differenzierung und zur Verlängerung der Neuriten [124, 127]. Sechs Stunden nach Serumentzug wurden die Zellen fixiert und mit Rhodamin-Phalloidin gefärbt, um das Aktinzytoskelett sichtbar zu machen.

Die Transfektion mit GFP-mLPP1 oder -1a führte in N1E-115-Zellen im Vergleich zu den GFP-transfizierten Kontrollzellen zu einer deutlichen Verlängerung der Neuriten. Das Aktinzytoskelett dieser verlängerten Neuriten zeigte in der Phalloidinfärbung keine auffälligen Unterschiede zu dem der Kontrollzellen (Abbildung 4.24A).

Zur Quantifizierung dieser Beobachtung wurde die Länge aller Neuriten $> 2 \mu\text{m}$ bestimmt. Die durchschnittliche Neuritenlänge betrug $7,7 \pm 0,5 \mu\text{m}$ für die GFP-transfizierten Kontrollzellen und $12,1 \pm 0,8 \mu\text{m}$ bzw. $12,8 \pm 0,8 \mu\text{m}$ für die GFP-mLPP1 bzw. -1a überexprimierenden Zellen (Abbildung 4.24B). Die statistische Auswertung der Neuritenlänge mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test ergab einen signifikanten Unterschied der GFP-LPP1- bzw. GFP-LPP1a-transfizierte Zellen *versus* der GFP-

transfizierten Kontrollzellen ($p < 0,001$). Beide Spleißvarianten hatten dieselbe Auswirkung auf die Neuritenlänge der N1E-115-Zellen (Abbildung 4.24).

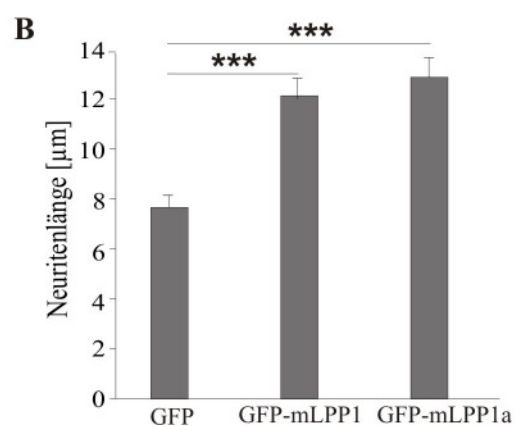
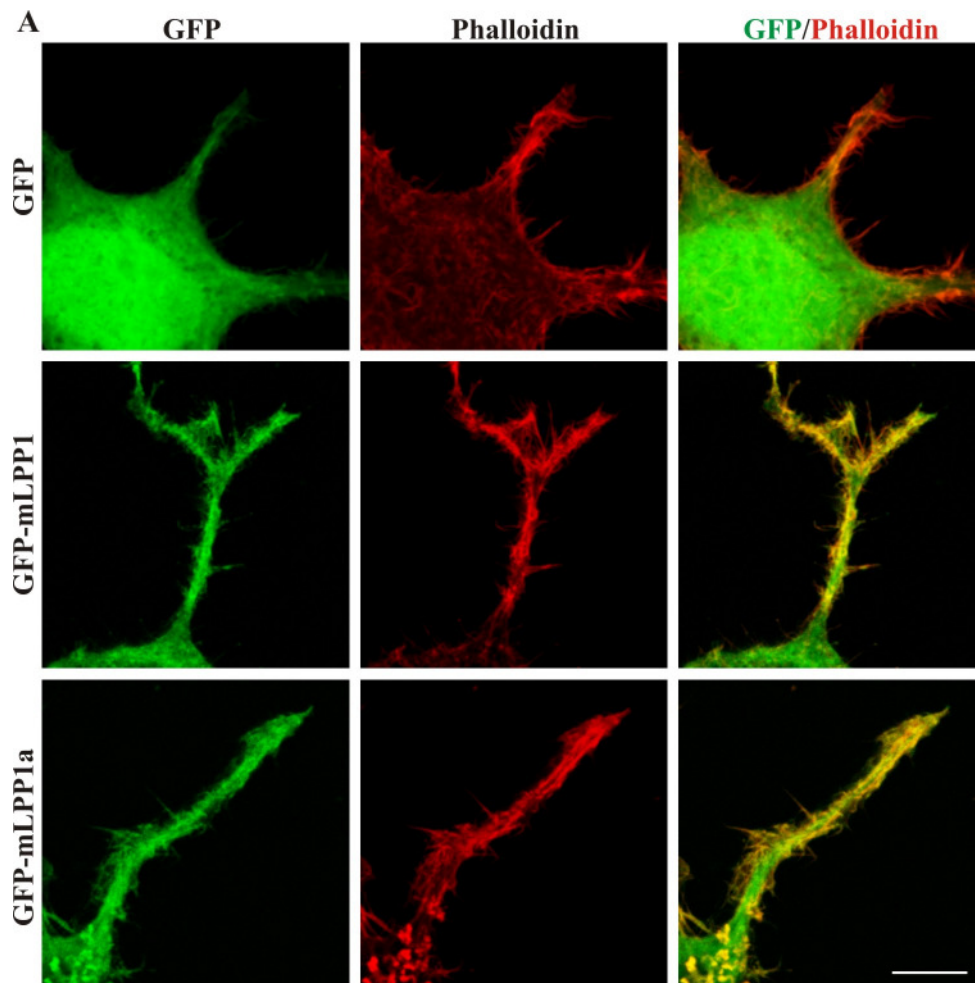


Abbildung 4.24: Überexpression von LPP1 oder -1a führt zum Auswachsen von Neuriten in N1E-115-Zellen. (A) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von N1E-115-Zellen, die mit GFP (oben), GFP-mLPP1 (Mitte) oder GFP-mLPP1a (unten) transfiziert wurden. Das Aktinzytoskelett wurde mit Rhodamin-Phalloidin gefärbt. Balken: 10 µm. (B) Durchschnittlichen Neuritenlänge der N1E-115-Zellen nach Differenzierung durch Serumentzug, zur Quantifizierung wurden alle Neuriten ab einer Länge von 2 µm herangezogen. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM. GFP: n = 111 Neuriten, GFP-mLPP1: n = 174 Neuriten und GFP-mLPP1a: n = 176 Neuriten, *** $p < 0,001$, Mann-Whitney-U-Test.

4.2.2.2 Knockdown von endogenem LPP1 und -1a in N1E-115-Zellen

Da die Überexpression von GFP-mLPP1 und -1a zu einer Neuritenverlängerung führte, sollte überprüft werden, ob die endogene LPP1- und -1a-Expression in N1E-115-Zellen für das natürliche Auswachsen von Neuriten erforderlich ist. Dies wurde mit Hilfe von RNA-Interferenz (RNAi) untersucht. RNAi kann genutzt werden, um mit Hilfe doppelsträngiger RNA-Moleküle gezielt die Expression eines Gens zu unterdrücken, um dessen Funktion zu untersuchen [128-130].

Vor Beginn der RNAi-Experimente wurde eine Expressionsanalyse auf RNA- und Proteinebene durchgeführt, um sicher zu stellen, dass LPP1 und -1a in N1E-115-Zellen endogen exprimiert werden. Mittels quantitativer Real-time RT-PCR konnte gezeigt werden, dass die mRNAs von *LPP1* und *-1a* in N1E-115-Zellen sowohl bei Kultivierung in serumhaltigem als auch in serumfreiem Medium exprimiert wurden. Unter beiden Kulturbedingungen wurde die Spleißvariante *LPP1a* ca. 10-fach stärker exprimiert als *LPP1* (Abbildung 4.25A). Im Immunblot konnte mittels Anti-LPP1/1a nachgewiesen werden, dass die vorhandenen mRNAs auch in Protein translatiert werden (Abbildung 4.25B). Ob dabei das Expressionsverhältnis beider Spleißvarianten erhalten bleibt, lässt sich aufgrund des identischen Molekulargewichts jedoch nicht sagen.

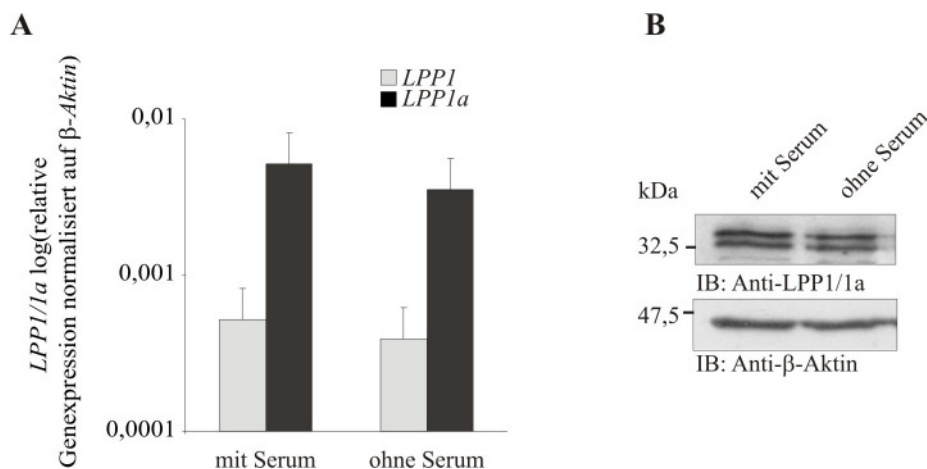


Abbildung 4.25: LPP1 und -1a werden in N1E-115-Zellen endogen auf mRNA- und Proteinebene exprimiert. (A) Quantitative Real-time RT-PCR von mRNA aus N1E-115-Zellen, die in serumhaltigem oder serumfreiem Medium kultiviert wurden. Die Daten wurden auf β -Aktin normalisiert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SD von n =3 Experimenten. (B) Repräsentativer Immunblot von Totalproteinlysaten aus N1E-115-Zellen, die mit oder ohne Serum kultiviert wurden. Der Nachweis erfolgte mit Anti-LPP1/1a. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von β -Aktin.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass N1E-115-Zellen LPP1 und -1a endogen exprimieren, konnte in weiteren Versuchen die Rolle dieser endogenen Expression auf die Zellmorphologie untersucht werden. Hierfür wurden unterschiedliche shRNA-Sequenzen in einen shRNA-Vektor kloniert. Diese Methode bietet im Gegensatz zu synthetischen small interfering RNAs

(siRNAs) den Vorteil, dass die Zellen die siRNAs aus der im Vektor kodierten shRNA direkt in der Zelle herstellen. Dies führt zu einer länger andauernden Degradation der Ziel-mRNA und damit zu einem längeren Ausschalten des Effekts des Zielproteins [131].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden jeweils drei unterschiedliche shRNAs gegen Sequenzen aus dem differenziell gespleißten Exon von *LPP1* und *-1a* und vier shRNAs aus den für *LPP1* und *-1a* gemeinsam gespleißten Exons in einen shRNA-Vektor kloniert (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Im Rahmen dieser Arbeit klonierte und getestete LPP1/1a- und Kontroll-shRNAs. Fett gedruckte shRNAs wurden für weiterführende Experimente ausgewählt.

Spezifität	Name
<i>mLPP1</i>	LPP1-shRNA 130
	LPP1-shRNA 160
	LPP1-shRNA 190
<i>mLPP1a</i>	LPP1a-shRNA 90
	LPP1a-shRNA 110
	LPP1a-shRNA 150
<i>mLPP1/1a</i>	LPP1/1a-shRNA 230
	LPP1/1a-shRNA 280
	LPP1/1a-shRNA 430
	LPP1/1a-shRNA 710
Negativkontrolle	Kontroll-shRNA

Zur Bestimmung der Knockdowneffizienz der einzelnen shRNAs wurden HEK293-Zellen verwendet, da diese eine wesentlich höhere Transfektionseffizienz aufweisen als N1E-115-Zellen oder primäre Neurone. HEK293-Zellen wurden mit GFP-mLPP1 oder -1a und der jeweiligen shRNA kotransfiziert. Der Nachweis von GFP-mLPP1 und -1a im anschließenden Immunblot erfolgte mit einem GFP-Antikörper zur Detektion des GFP-Fusionsproteins. Als Beladungskontrolle diente der Nachweis von β -Aktin. Die LPP1-shRNA 190 und die LPP1a-shRNA 90 stellten sich als geeignet heraus, die LPP1- bzw. -1a-Expression, bei unveränderter Expression der jeweils anderen Spleißvariante, spezifisch zu reduzieren. Zum gleichzeitigen Knockdown beider Spleißvarianten eignete sich die LPP1/1a-shRNA 230 (Abbildung 4.26). Als weitere Kontrolle neben dem Leervektor wurde eine shRNA verwendet, deren Sequenz von der Luziferase des Leuchtkäfers abgeleitet wurde [132] und die somit keine Ziel-mRNA im Transkriptom der Maus erkennen und degradieren sollte.

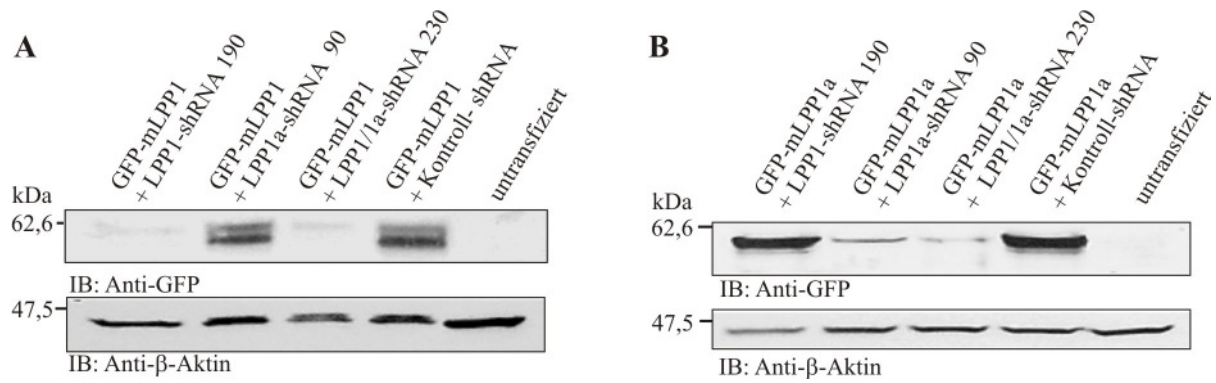


Abbildung 4.26: Test verschiedener shRNAs im Hinblick auf ihre Knockdowneffizienz gegenüber LPP1 und/oder -1a. Zum Knockdown von LPP1 und/oder -1a wurden unterschiedliche shRNA-Sequenzen in einen shRNA-Vektor kloniert. Um die Knockdowneffizienz dieser shRNA-Plasmide zu testen, wurde eine Kotransfektion von GFP-mLPP1 oder GFP-mLPP1a mit jeweils einem shRNA-Plasmid in HEK293-Zellen durchgeführt. Der Nachweis von GFP-mLPP1 (A) und GFP-mLPP1a (B) erfolgte im Immunblot mit Hilfe eines GFP-Antikörpers. Als Beladungskontrolle diente der Nachweis von β -Aktin. Dargestellt sind repräsentative Immunblots der shRNAs, die zur weiteren Verwendung ausgewählt wurden.

Im Anschluss an die Auswahl der spezifischen shRNA-Plasmide (Tabelle 4.1) wurde die Auswirkung des Knockdowns von endogenem LPP1 und -1a auf das Neuritenwachstum in N1E-115-Zellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden N1E-115-Zellen mit den unterschiedlichen shRNAs transfiziert, zur Induktion des Neuritenwachstums serumfrei kultiviert und anschließend untersucht.

Erfolgreich mit shRNA transfizierte Zellen waren am GFP-Signal zu erkennen, da der verwendete Vektor zusätzlich zur shRNA für GFP kodierte. Nur diese Zellen wurden zur Auswertung herangezogen. Auch in diesem Experiment war ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem LPP1- und LPP1a-Gehalt der Zellen und der Neuritenlänge zu erkennen (Abbildung 4.27). Zellen mit einem Knockdown mittels LPP1/1a-shRNA hatten nur halb so lange Neuriten wie die Kontrollzellen (Kontroll-shRNA: $8,2 \pm 0,3 \mu\text{m}$; LPP1/1a-shRNA: $4,1 \pm 0,1 \mu\text{m}$; $p < 0,001$). Auch der spezifische Knockdown von LPP1 oder -1a führte zu einer signifikanten Reduktion der Neuritenlänge, wenn auch weniger stark als der gleichzeitige Knockdown beider Spleißvarianten (LPP1-shRNA: $5,0 \pm 0,2 \mu\text{m}$; LPP1a-shRNA: $5,3 \pm 0,2 \mu\text{m}$; $p < 0,001$). Die durchschnittliche Neuritenlänge von Kontrollzellen, die entweder mit dem Leervektor oder der Kontroll-shRNA transfiziert worden waren, unterschied sich nicht (Abbildung 4.27).

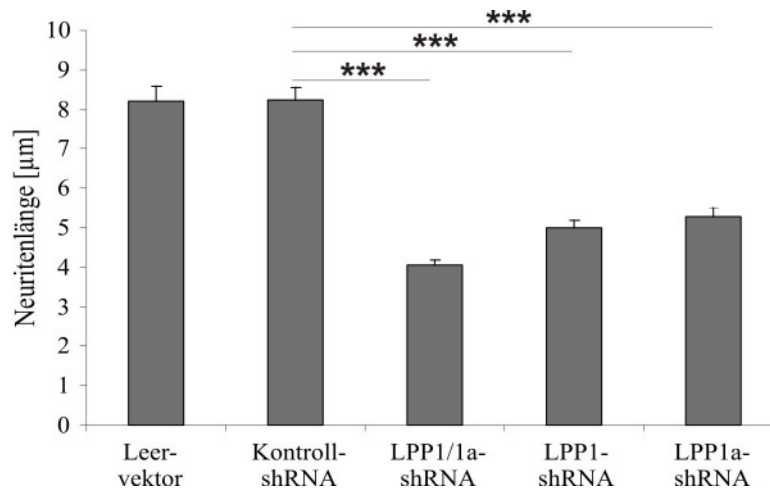


Abbildung 4.27: Knockdown von endogenem LPP und -1a führt in N1E-115-Zellen zu einer Verkürzung der Neuriten. N1E-115-Zellen wurden mit shRNA-Plasmiden gegen LPP1, LPP1a, LPP1 und -1a zusammen, dem Leervektor oder einer Kontroll-shRNA transfiziert. Dargestellt ist die durchschnittliche Neuritenlänge der N1E-115-Zellen, zur Quantifizierung wurden alle Neuriten ab einer Länge von 2 µm herangezogen. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM. Leervektor: n = 184 Neuriten, Kontroll-shRNA: n = 198 Neuriten, LPP1/1a-shRNA n = 184 Neuriten, LPP1-shRNA n = 173 Neuriten und LPP1a-shRNA n = 191 Neuriten, ***p<0,001, Mann-Whitney-U-Test.

In Zusammenfassung dieser Daten lässt sich sagen, dass die Expression von LPP1 und -1a einen Einfluss auf die Neuritenlänge von N1E-115-Neuroblastomzellen hat. Je mehr LPP1 und/oder -1a exprimiert wird, desto länger sind die von den Zellen ausgebildeten Neuriten.

4.2.3 Endogene LPP1- und -1a-Expression

Bisher wurde die Expression von LPP1 und -1a nur mittels semiquantitativer Northern Blot-Analysen an humanem und Rattengewebe untersucht [87, 90]. Die entwicklungsabhängige Expression von LPP1 und -1a ist dagegen noch vollkommen unbekannt. Deshalb wurde im Folgenden sowohl die gewebeabhängige mRNA-Expression beider Spleißvarianten als auch die Expression während der Entwicklung an Mausgeweben quantitativ untersucht.

4.2.3.1 LPP1 und -1a in unterschiedlichen Mausgeweben

Mittels quantitativer Real-time RT-PCR wurde die relative mRNA-Menge von *LPP1* und *-1a* in unterschiedlichen Mausgeweben am postnatalen Tag 5 und 30 (P5 und P30) untersucht. Dazu wurden Taqman-Sonden verwendet, die jeweils nur eine Spleißvariante spezifisch erkannten. Dabei fiel auf, dass *LPP1a*, wie schon bei N1E-115-Zellen beobachtet, in beiden postnatalen Stadien und in allen untersuchten Geweben eine deutlich stärkere Expression aufwies als *LPP1*. An P5 unterschied sich die *LPP1a*-Expression in den untersuchten

Geweben mit Ausnahme des Thymus kaum. Die *LPP1*-mRNA wurde an P5 am stärksten in Lunge und Niere exprimiert (Abbildung 4.28A). An P30 konnte die mit Abstand stärkste *LPP1a*-Expression im Hoden gezeigt werden. *LPP1* wies neben der starken Expression im Hoden noch eine vergleichbar starke Expression in Lunge und Niere auf. (Abbildung 4.28B). Im Gehirn konnte sowohl an P5 als auch an P30 eine Expression von *LPP1*- und *LPP1a*-mRNA nachgewiesen werden. Die Daten wurden auf β -Aktin normalisiert.

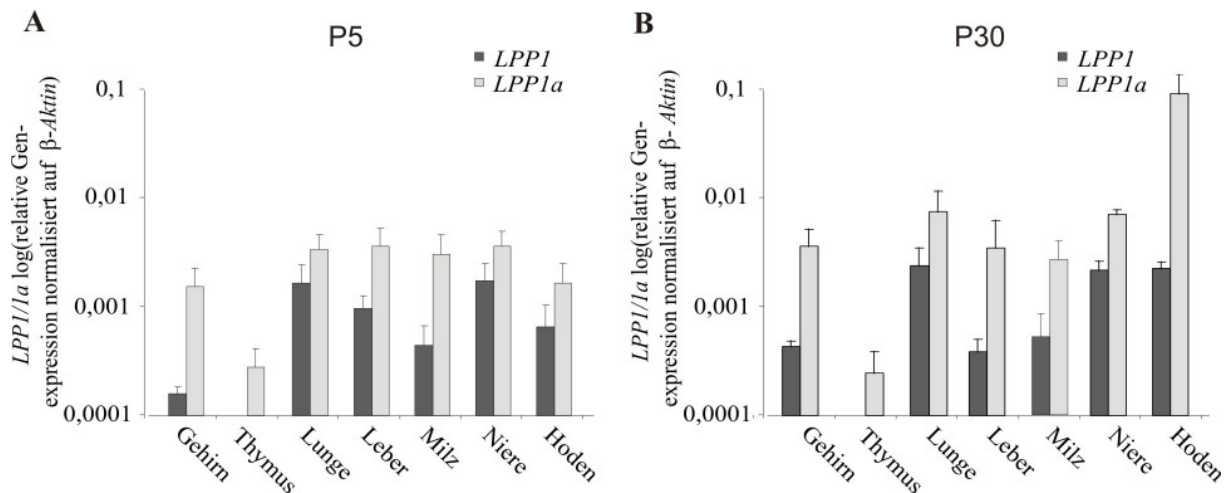


Abbildung 4.28: *LPP1*- und *LPP1a*-mRNA-Expression in unterschiedlichen Mausgeweben. Quantitative Real-time RT-PCR zur Untersuchung der *LPP1*- und *LPP1a*-Expression in unterschiedlichen Mausgeweben die an P5 (A) oder P30 (B) entnommen wurden. Die Daten wurden auf β -Aktin normalisiert und stellen die Mittelwerte \pm SD von $n = 3$ Experimenten dar. Pro Experiment wurde das Gewebe von mindestens drei Mäusen vereinigt.

4.2.3.2 *LPP1* und *-1a* während der Entwicklung

Obwohl die *LPP1* und *-1a*-Expression in manchen Organen stärker war als im Gehirn, sollte im Hinblick auf eine eventuelle Rolle von *LPP1* und *-1a* in neuronalen Zellen (Kapitel 4.2.2) untersucht werden, ob die *LPP1* und *-1a*-Expression im Gehirn entwicklungsabhängig reguliert wird. Dazu wurde mittels quantitativer Real-time RT-PCR der relative *LPP1*- und *-1a*-Gehalt im Mauskortex zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten zwischen E14 und P30 untersucht. Beide mRNAs wurden während der gesamten Entwicklung exprimiert und ihre Expression ist nur schwach reguliert. Es bestätigte sich, dass die Spleißvariante *LPP1a* konstant ungefähr 10-fach stärker exprimiert wurde als *LPP1* (Abbildung 4.29).

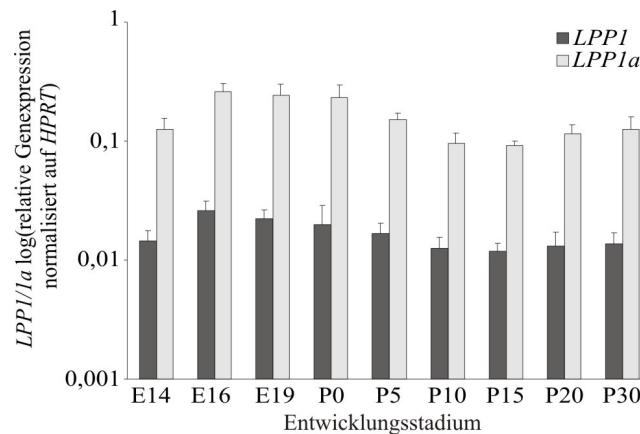


Abbildung 4.29: Expression von LPP1 und -1a im Mauskortex während der Entwicklung. Quantitative Real-time RT-PCR von Mauskortex zu unterschiedlichen embryonalen und postnatalen Entwicklungsstadien (E14 bis P30). Die Expression von *LPP1* und *-1a* ist zwischen E14 und P30 nur schwach reguliert. *LPP1a* wird immer ca. 10-fach stärker exprimiert als *LPP1*. Die Ergebnisse wurden auf *HPRT* normalisiert und stellen die Mittelwerte \pm SD von $n = 3$ Experimenten dar. In jedem dieser Experiment wurde das Gewebe von mindestens drei Mäusen vereinigt.

4.2.3.3 *LPP1*- und *-1a*-Expression in Neuronen

Nachdem eine Expression von *LPP1* und *-1a* im embryonalen Kortex nachgewiesen werden konnte, wurde untersucht, welche Zelltypen des Kortex für die *LPP1*- und *-1a*-Expression verantwortlich sind. Dazu wurden primäre Neurone, Astrozyten und Mikroglia der Maus isoliert und mittels quantitativer Real-time RT-PCR analog Kapitel 4.1.3.3 untersucht. Die Identität und Reinheit der Zellen war dort bereits mittels der zelltypenspezifischen Marker *Tuj1*, *GFAP* und *Iba1* nachgewiesen worden (Abbildung 4.11C).

Es konnte gezeigt werden, dass *LPP1a* am stärksten von primären Neuronen und Astrozyten exprimiert wurde. In Neuronen wurde *LPP1a* ca. 10-fach stärker exprimiert als *LPP1*. In Astrozyten und Mikroglia waren die Expressionsunterschiede zwischen den beiden Spleißvarianten geringer (Abbildung 4.30).

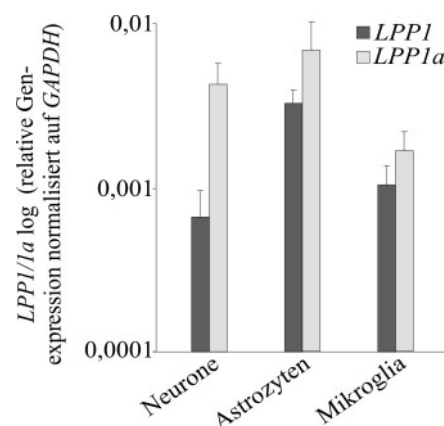


Abbildung 4.30: *LPP1*- und *-1a*-Expression in primären Neuronen, Astrozyten und Mikroglia. Quantitative Real-time RT-PCR. Neurone, Astrozyten und Mikroglia wurden aus embryonalen bzw. früh postnatalen Mäusen isoliert. Von primären Neuronen wurde nach 12 Tagen, von den primären Astrozyten und Mikroglia nach 18 Tagen Kulturdauer RNA isoliert. Die Ergebnisse wurden auf *GAPDH* normalisiert und sind Mittelwerte \pm SD von $n = 3$ Experimenten.

Zur Lokalisation der LPP1- und -1a-Proteinexpression im Gewebe wurde eine immunhistochemische Färbung von LPP1 und -1a im embryonalen Mausekortex (E18,5) durchgeführt. Mittels Anti-LPP1/1a konnten LPP1- und/oder LPP1a-Protein in der gesamten kortikalen Platte detektiert werden. Zusätzlich wurden die Gehirne gegen das neuronale Markerprotein MAP2 gefärbt. Die Kolo­kalisierung von LPP1 und -1a mit MAP2 bestätigte die LPP1- und/oder -1a-Proteinexpression in embryonalen kortikalen Neuronen *in vivo* (Abbildung 4.31).

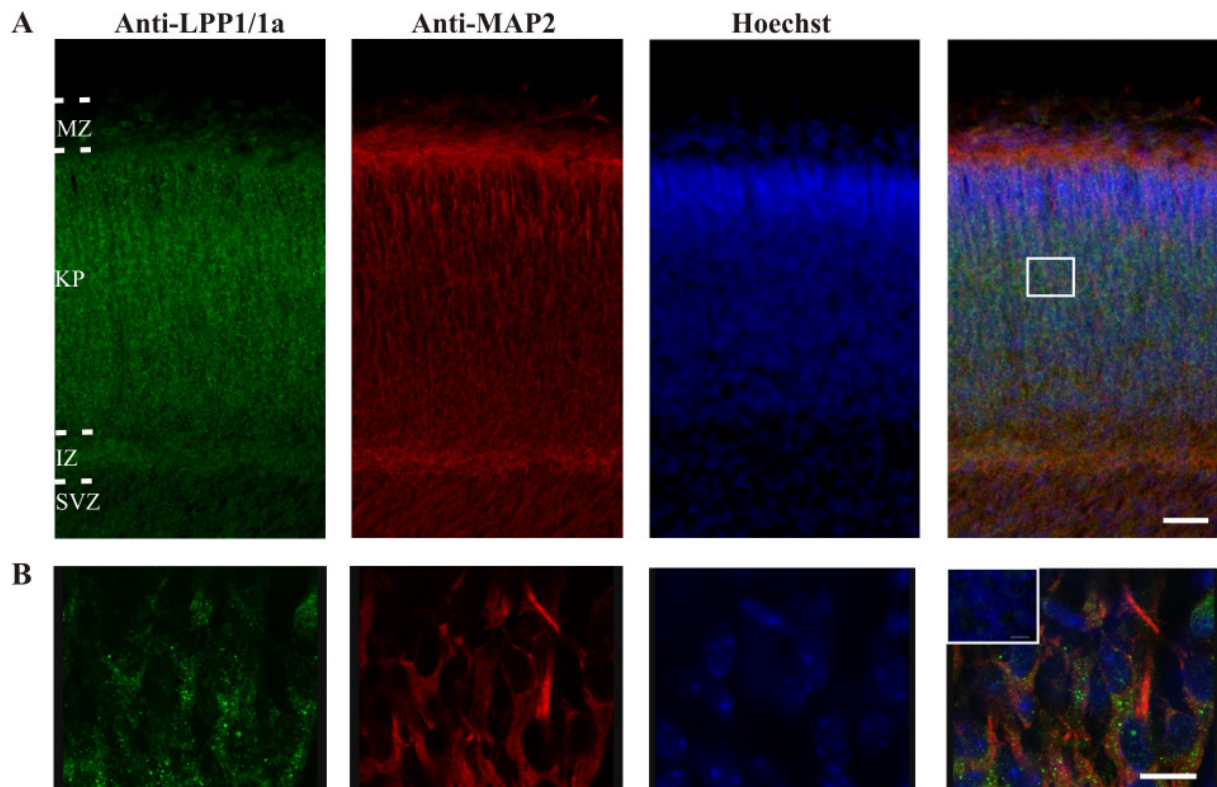


Abbildung 4.31: LPP1 und -1a werden von embryonalen kortikalen Neuronen *in vivo* exprimiert. Repräsentative mikroskopische Aufnahmen einer immunhistochemischen Färbung mittels LPP1/1a-Antikörper im Mausekortex an E18,5. Die Kolo­kalisationsfärbung mit dem neuronalen Marker MAP2 zeigt eine Expression von LPP1/1a in Neuronen. Die Zellkerne wurden mit Hoechst-Lösung sichtbar gemacht. (A) Übersicht, Balken: 50 μm , MZ: Marginalzone, KP: kortikale Platte; IZ: Intermediärzone; SVZ: subventrikuläre Zone. (B) Vergrößerung des markierten Bereichs, beispielhaft wurde oben links in der Überlagerung eine Kontrollfärbung ohne Primärantikörper dargestellt. Balken: 10 μm .

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *LPP1* und *-1a* in allen untersuchten Geweben exprimiert werden, *LPP1a* dabei stets stärker als *LPP1*. Zudem konnte eine neuronale Expression *in vivo* nachgewiesen werden.

4.2.4 Funktion von LPP1 und -1a während der Kortextentwicklung

Lysophosphatidsäure (LPA) spielt während der Kortextentwicklung eine wichtige Rolle. Zum Beispiel führt die extrazelluläre Gabe von LPA *ex vivo* in embryonalen Gehirnkulturen zu einer Ausweitung des zerebralen Kortext durch eine rezeptorabhängig reduzierte Apoptose und eine Zunahme der terminalen Mitose neuronaler Vorläuferzellen [58]. Dies legt die Vermutung nahe, dass auch die LPA-degradierenden Enzyme LPP1 und -1a eine Rolle in diesem Prozess spielen. Nachdem gezeigt werden konnte, dass LPP1 und -1a während der Entwicklung in kortikalen Neuronen exprimiert werden, sollte nun ihre Funktion mittels shRNA-vermitteltem Knockdown *in utero* untersucht werden.

4.2.4.1 Störung der radialen Kortextmigration an E18,5

Mit der Elektroporationstechnik *in utero* kann Plasmid-DNA in kortikale Vorläuferzellen von sich entwickelnden Mausembryonen eingebracht werden [133, 134]. Dazu wird die Plasmid-DNA *in utero* in den Ventrikel embryonaler Maushirne injiziert. Durch Anlegen elektrischer Spannung erfolgt eine Transfektion neuronaler Vorläuferzellen, die in der ventrikulären Zone gebildet werden. Die so behandelten Embryonen können sich danach im Muttertier weiterentwickeln, bis sie entweder einige Tage später zur Analyse entnommen oder geboren werden (Abbildung 4.32) [135, 136]. Dies ist eine etablierte Methode, um Vorgänge im Rahmen der Bildung und Migration von Neuronen während der Entwicklung des zerebralen Kortext zu untersuchen [48, 110, 137-139].

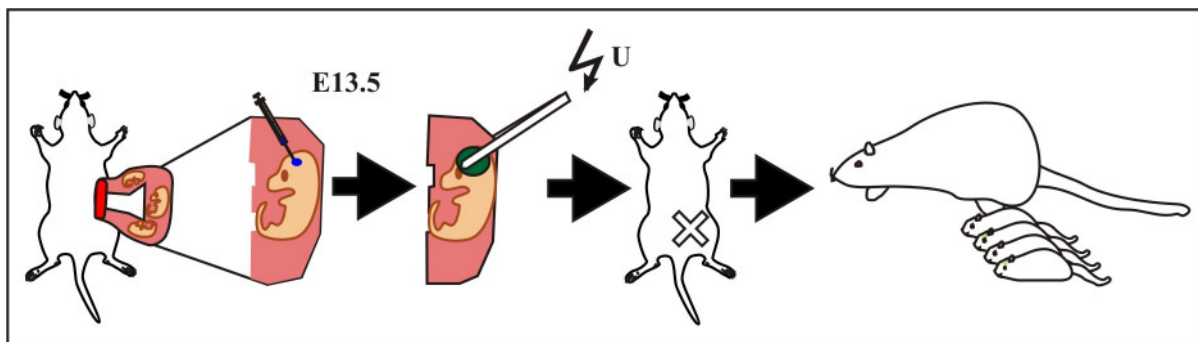


Abbildung 4.32: Elektroporation von Mausembryonen *in utero*. Schematische Darstellung der Elektroporation *in utero*. Terminiert verpaarte Weibchen wurden an E13,5 narkotisiert, der Bauchraum eröffnet und der Uterus herausgezogen. In einen Ventrikel von je zwei Embryonen einer Mutter wurde Plasmid-DNA injiziert. Anschließend wurden in den Embryonen durch Anlegen elektrischer Spannung (U) neuronale Vorläuferzellen in der ventrikulären Zone transfiziert. Der Uterus wurde danach zurück in die Mutter überführt und die Wunde vernäht. Die Gehirne der elektroporierten Embryonen wurden an E14,5, E15,5, E18,5 oder P5 zur weiteren Analyse entnommen (Abbildung modifiziert nach [137]).

Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurde die LPP1/1a-shRNA 230 (siehe Kapitel 4.2.2.2) am Tag E13,5 in Mausembryonen *in utero* elektroporiert. Da die Expression der shRNA im Gehirn des Embryos stark vom verwendeten Promotor abhängt, wurde die

shRNA in einen Vektor kloniert, der als Promotor eine Fusion aus dem Cytomegalovirus Immediate early Enhancer und einem Hühner β -Aktin-Promotor besitzt. Dadurch kommt es nach Elektroporation zu einer starken shRNA-Expression im embryonalen Stadium, die noch mindestens drei Wochen nach der Geburt anhält [136]. Da das pCGLH-Plasmid zusätzlich für GFP kodiert, kann der GFP-Nachweis verwendet werden, um transfizierte Zellen sichtbar zu machen. Das Plasmid pCGLH-LPP1/1a-shRNA 230 war im Gegensatz zum Kontrollplasmid mit der shRNA gegen Luziferase bei Kotransfektion mit GFP-mLPP1 oder -1a in HEK293-Zellen in der Lage war, die Expression beider Fusionsproteine zu reduzieren (Abbildung 4.33).

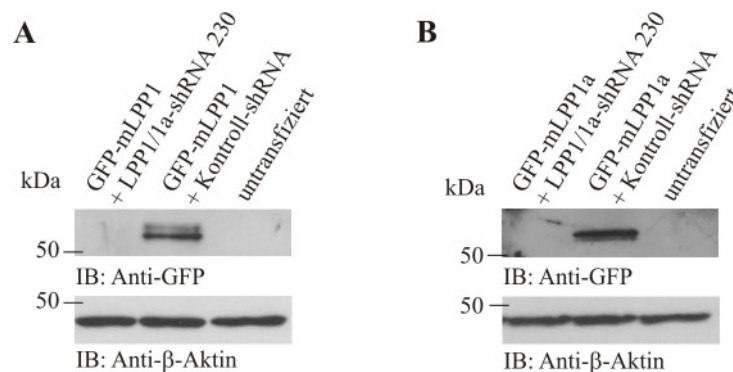


Abbildung 4.33: Test der Knockdowneffizienz von LPP1 und -1a durch die in der Elektroporation *in utero* verwendeten Plasmide. Die LPP1/1a-shRNA 230 und die Kontroll-shRNA wurden nach Umklonierung der shRNAs in das pCGLH-Plasmid erneut in HEK293-Zellen mit GFP-mLPP1 (A) oder GFP-mLPP1a (B) kotransfiziert und das Totalproteinlysate im Immunblot analysiert. Dabei erwies sich die LPP1/1a-shRNA 230 wiederum als geeignet. Der Nachweis der LPP1/1a-Expression erfolgte mit einem GFP-Antikörper. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von β -Aktin.

Die von einem Kooperationspartner (Jan Baumgart) an E13,5 mit LPP1/1a-shRNA oder Kontroll-shRNA elektroporierten Gehirne wurden an E18,5 entnommen und fixiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden dann Gewebeschnitte der Gehirne angefertigt und diese mit unterschiedlichen Antikörpern immunhistochemisch gefärbt, mikroskopiert und die Ergebnisse statistisch ausgewertet. Um eventuelle Unterschiede im Migrationsverhalten durch geringe Altersunterschiede der Embryonen bei der Elektroporation auszuschließen, wurde in jeder Mutter ein Embryo mit der LPP1/1a-shRNA elektroporiert und ein zweiter mit der Kontroll-shRNA. Es wurden nur Embryonen aus Müttern berücksichtigt, in denen beide Embryonen überlebt hatten und die beide technisch korrekt elektroporiert worden waren.

Fünf Tage nach Elektroporation (E18,5) waren transfizierte Zellen in der kortikalen Platte positiv für den neuronalen Marker Tuj1, der spezifisch in postmitotischen Neuronen vorkommt (Abbildung 4.34C). Zu diesem Zeitpunkt waren die meisten mit der Kontroll-shRNA transfizierten Neurone bereits bis in die oberen Schichten der kortikalen Platte migriert. Im Gegensatz dazu waren nur wenige Neurone, in denen LPP1 und -1a mittels

shRNA reduziert worden waren, in den oberen kortikalen Schichten angekommen. Die meisten dieser Neurone waren noch in den mittleren und unteren Schichten der kortikalen Platte lokalisiert (Abbildung 4.34A). Zur statistischen Auswertung der Migrationsbewegung wurde die kortikale Platte in acht Abschnitte gleicher Größe unterteilt. Abschnitt 1 repräsentiert die Marginalzone und die Abschnitte 2 - 8 umfassen die kortikale Platte bis zur oberen Grenze der Intermediärzone. Anschließend wurden die GFP-exprimierenden Neurone in jedem Abschnitt gezählt und der Anteil GFP-positiver Zellen in den einzelnen Abschnitten berechnet (Abbildung 4.34B): Bei vergleichbarer Transfektionseffizienz der beiden shRNA-Plasmide befanden sich in Abschnitt 2 41 % aller mit Kontroll-shRNA transfizierten Neurone, während nur 17 % der LPP1/1a-shRNA-transfizierten Neurone zu diesem Zeitpunkt dort angekommen waren. Dafür war der Anteil GFP-positiver Zellen in den Abschnitten 4 bis 7 bei den LPP1/1a-shRNA-elektroporierten Gehirnen wesentlich größer als in den Kontroll-shRNA-Gehirnen. Kontroll-shRNA-transfizierte Neurone waren durchschnittlich in Abschnitt $2,9 \pm 0,4$ lokalisiert, während sich die durchschnittliche Position LPP1/1a-shRNA-transfizierter Neurone mit Abschnitt $4,1 \pm 0,2$ davon signifikant unterschied (Abbildung 4.34B, Mann-Whitney-U-Test; $p = 0,007$).

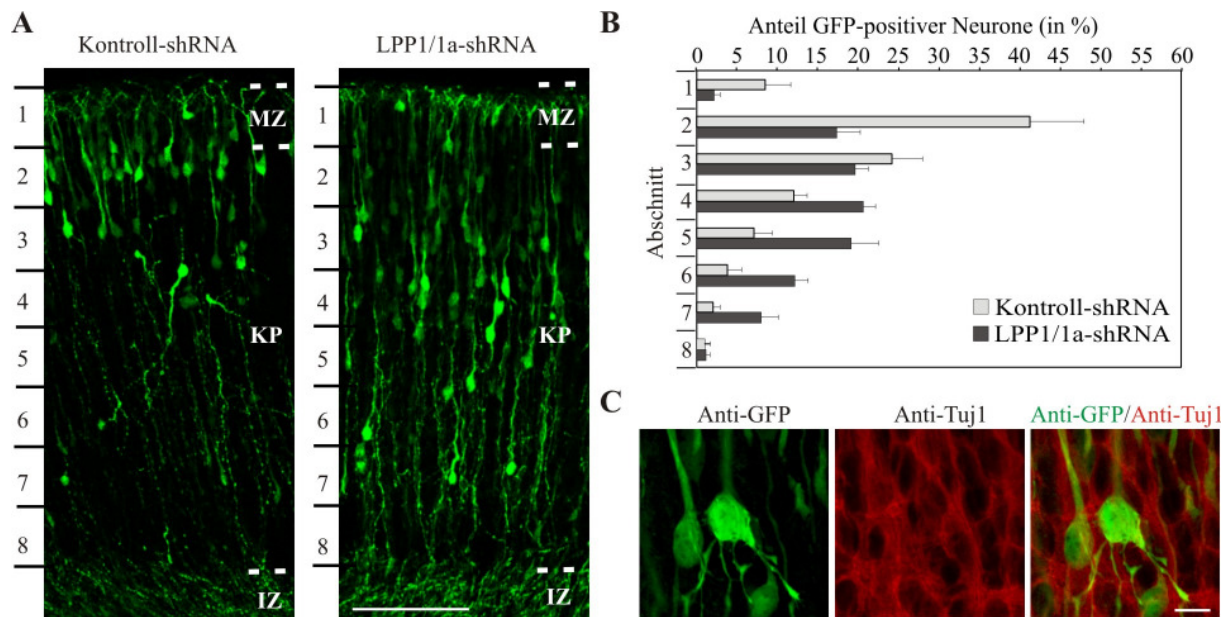


Abbildung 4.34: Knockdown von LPP1 und -1a von E13,5 bis E18,5 verursacht eine Störung der radialen Kortextmigration. (A) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der kortikalen Platte von Gehirnen, die an E13,5 mit einer Kontroll- (links) oder einer LPP1/1a-shRNA (rechts) *in utero* elektroporiert worden waren, fünf Tage nach Elektroporation. Die Gehirne wurden zur Verstärkung des GFP-Signals der transfizierten Zellen mit einem GFP-Antikörper gefärbt. Balken: 100 µm, MZ: Marginalzone, KP: kortikale Platte; IZ: Intermediärzone, 1 - 8: Abschnitte, die für die Quantifizierung der neuronalen Migration verwendet wurden. (B) Quantifizierung der Neuronenposition an E18,5. Dargestellt ist der durchschnittliche Anteil aller GFP-positiven Zellen im jeweiligen Abschnitt für je $n = 6$ Kontroll-shRNA- und LPP1/1a-shRNA-elektroporierte Gehirne. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM. (C) Mikroskopische Aufnahme einer immunhistochemischen Färbung mit Anti-GFP und Anti-Tuj1 zum Nachweis der neuronalen Identität der GFP-positiven Neurone in der kortikalen Platte. Balken: 10 µm.

Da die acht Abschnitte zur Neuronenlokalisierung im Kortex willkürlich gewählt worden waren und nicht die kortikalen Schichten repräsentieren, sollten die GFP-positiven Neurone zusätzlich mit schichtenspezifischen Markerproteinen kolokalisiert werden. Dabei diente der Transcription Factor Brain2 (Brn2) als Marker für die oberen kortikalen Schichten und der T box transcription factor1 (Tbr1) als einer für die unteren kortikalen Schichten. Die mit Kontroll-shRNA transfizierten Neurone waren größtenteils in den Brn2-positiven, oberen kortikalen Schichten zu finden. Im Gegensatz dazu befand sich dort nur ein geringerer Anteil der mit LPP1/1a-shRNA-transfizierten Neurone. Die restlichen LPP1/1a-shRNA-transfizierten Neurone waren in den Tbr1-positiven, unteren kortikalen Schichten lokalisiert, in denen nur vereinzelt Kontroll-shRNA-transfizierte Neurone zu finden waren (Abbildung 4.35).

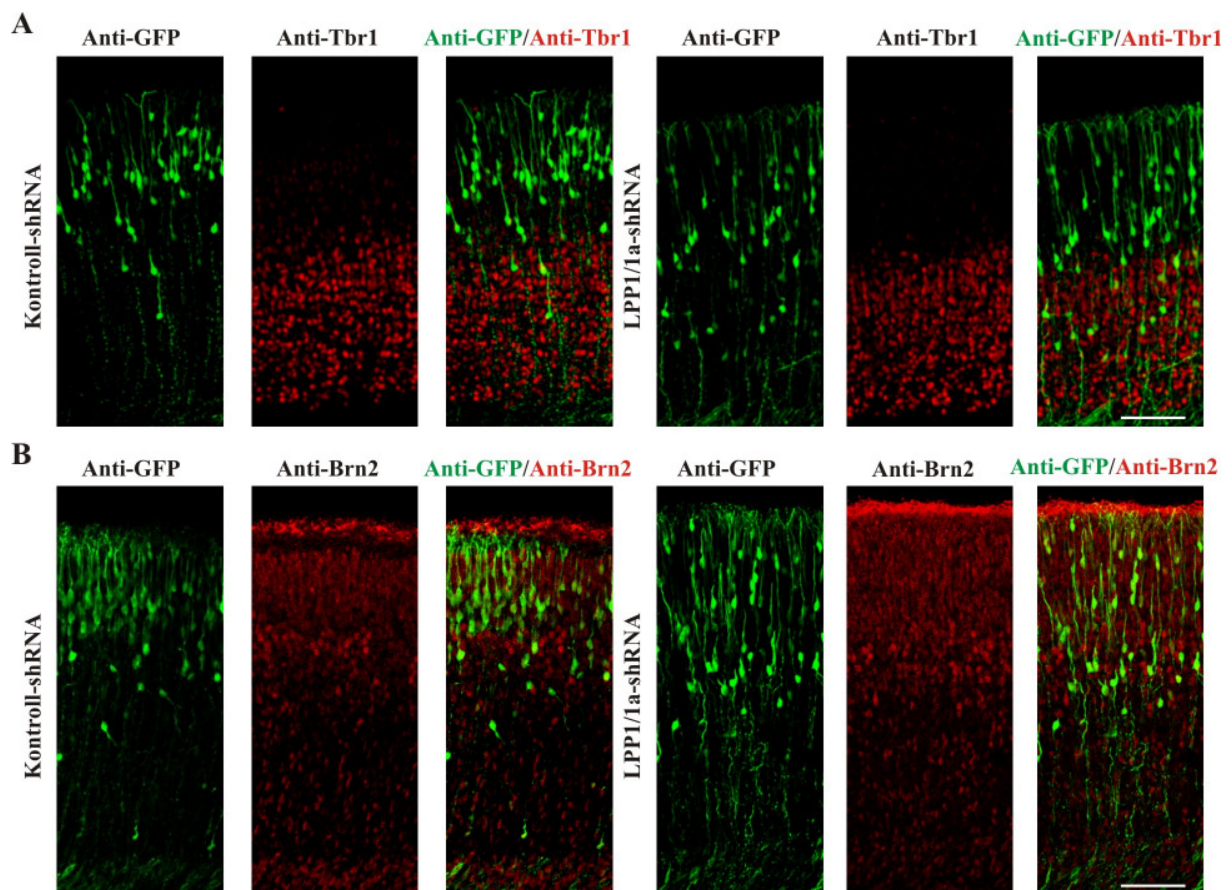


Abbildung 4.35: Immunhistochemische Färbung der kortikalen Platte mit schichtenspezifischen Markern. Embryonen wurden an E13,5 *in utero* mit Kontroll-shRNA (links) oder LPP1/1a-shRNA (rechts) elektroporiert und an E18,5 entnommen. Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen immunhistochemischer Färbungen mit Anti-Tbr1 (A) und Anti-Brn2 (B). Während Tbr1 vermehrt von Neuronen in den unteren kortikalen Schichten exprimiert wird, ist Brn2 ein Marker für die oberen kortikalen Schichten. LPP1/1a-shRNA-transfizierte Neurone waren im Vergleich zu Kontroll-shRNA-transfizierten Neuronen vermehrt in den Tbr1-positiven, unteren Schichten lokalisiert. Balken: 100 µm.

4.2.4.2 Migrationsstopp der Neurone in den unteren kortikalen Schichten

Für die im Vergleich zu den Kontrollneuronen veränderte Lokalisation der LPP1/1a-shRNA-transfizierten Neurone kommen zwei Ursachen in Betracht. Zum einen könnte der LPP1/1a-Knockdown die Migration dieser Neurone verlangsamen, sodass sie an E18,5 im Gegensatz zu den mit Kontroll-shRNA- oder untransfizierten Neuronen noch nicht in den oberen kortikalen Schichten angekommen wären. Zum anderen könnte die Elektroporation mit LPP1/1a-shRNA zum Migrationsstopp der Neurone in den unteren kortikalen Schichten führen. Zur Klärung, welche dieser zwei Ursachen für die veränderte radiale Migration der LPP1/1a-Knockdown-Neurone verantwortlich ist, wurden an E13,5 elektroporierte Embryonen zusätzlich an P5 untersucht. Auch an P5 waren die meisten der Kontroll-shRNA-Neurone in den oberen kortikalen Schichten zu finden. Die LPP1/1a-shRNA-transfizierten Neurone waren aber wie an E18,5 noch im gesamten Kortex verteilt (Abbildung 4.36A).

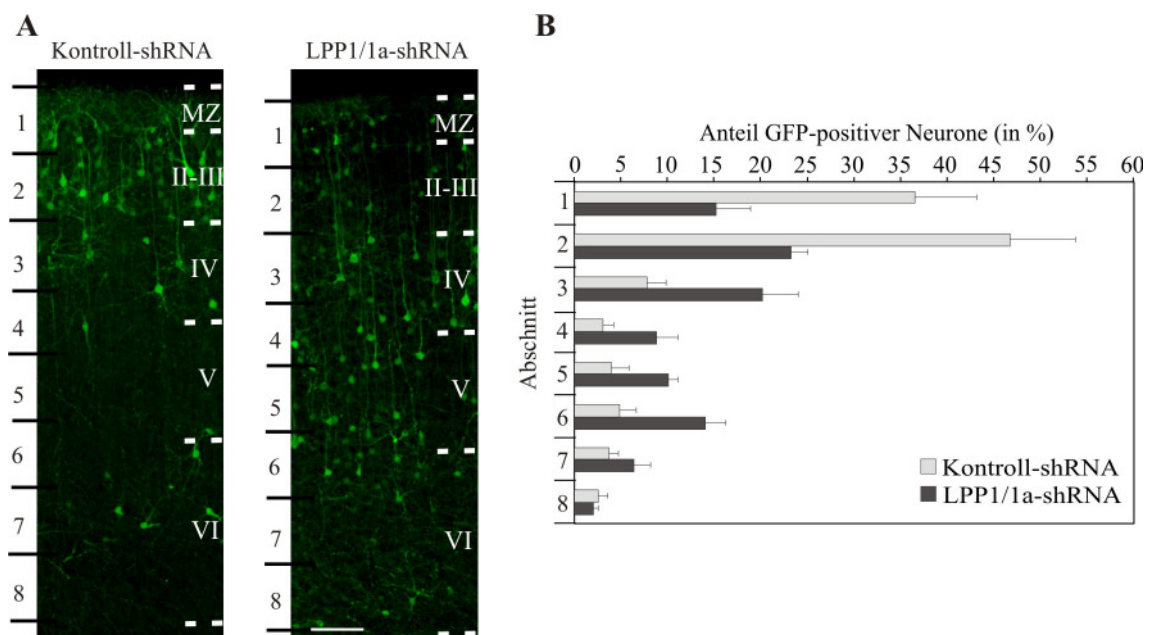


Abbildung 4.36: Die Störung der kortikalen Migration von LPP1/1a-shRNA-transfizierten Neuronen wird durch einen Migrationsstopp verursacht. Mausembryonen wurden an E13,5 elektroporiert und an P5 untersucht. (A) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen einer immunhistochemischen Färbung mit einem GFP-Antikörper zur Verstärkung des GFP-Signals von Kontroll- (links) oder LPP1/1a-shRNA- (rechts) transfizierten Neuronen. Balken: 100 μ m, MZ: Marginalzone, II - VI: kortikale Schichten, 1 - 8: Abschnitte, die für die Quantifizierung verwendet wurden. (B) Quantifizierung der durchschnittlichen Position von LPP1/1a-shRNA-transfizierten Neuronen (n = 7) an P5 innerhalb der kortikalen Platte im Vergleich zu Kontroll-shRNA-Neuronen (n = 5). Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM.

Die quantitative Auswertung ergab, dass die meisten GFP-positiven Kontroll-shRNA-Neurone in Abschnitt 1 und 2 zu finden waren. In diesen Abschnitten waren signifikant weniger LPP1/1a-shRNA-transfizierte Neurone lokalisiert. Dafür befanden sich in den

unteren Abschnitten der kortikalen Platte mehr LPP1/1a-shRNA-Neurone als in den Kontrollen (Abbildung 4.36B). Die durchschnittliche Position für Kontroll-shRNA-Neurone betrug Abschnitt $2,6 \pm 0,3$ und Abschnitt $3,5 \pm 0,2$ für LPP1/1a-shRNA-Neurone (Mann-Whitney-U-Test, $p = 0,012$). Die Migrationsstörung an E18,5 ist also nicht auf eine verlangsamte Wanderung der Neurone zurückzuführen, sondern auf einen Migrationsstopp eines großen Teils der LPP1/1a-shRNA-Neurone in den unteren kortikalen Schichten.

Da die LPP1- und -1a-Expression in N1E-115-Neuroblastomzellen einen Einfluss auf die Zellmorphologie hatte (siehe Kapitel 4.2.2), sollte im Folgenden untersucht werden, ob LPP1/1a-shRNA-transfizierte Neurone ebenfalls morphologische Unterschiede zu den Kontroll-shRNA-Neuronen aufwiesen. Kortikale Neurone besitzen während der radialen Migration einen Hauptausläufer, der das Neuron entlang der Radialglia zu seinem Bestimmungsort innerhalb der kortikalen Platte führt, und ein nach unten gerichtetes Axon, das dem migrierenden Neuron folgt [7]. An E13,5 mit LPP1/1a-shRNA transfizierte Neurone besaßen an E18,5 ebenso wie die mit Kontroll-shRNA transfizierten Neurone diese charakteristische Morphologie (Abbildung 4.34, Abbildung 4.35).

An P5 ist die Zellmorphologie kortikaler Neurone bereits wesentlich komplexer. In der vorliegenden Arbeit wurde ein besonderes Augenmerk auf die Morphologie der LPP1/1a-shRNA-transfizierten Neurone mit verändertem Migrationsverhalten gelegt, sodass im Folgenden Neurone aus der Schicht V genauer morphologisch untersucht wurden. Während der Entwicklung bildet sich der Kortex von innen nach außen. Das bedeutet, dass Schicht V-Neurone in der unteren kortikalen Platte früher gebildet werden als die der Schichten II-III in der oberen kortikalen Platte (Kapitel 1.2.2). An E13,5 mit Kontroll-shRNA transfizierte Neurone befanden sich an P5 in den Schichten II-III und nicht wie ein großer Teil der LPP1/1a-shRNA-transfizierten Neurone noch in Schicht V (Abbildung 4.36). Damit sich GFP-positive Kontrollneurone in der Schicht V befinden, wurden Embryonen an E12,5 mit Kontroll-shRNA transfiziert, da diese früher gebildeten Neurone die unteren kortikalen Schichten bilden. Die Morphologie und Ausrichtung der LPP1/1a-shRNA-transfizierten Neurone war an P5 im Vergleich zu den Kontroll-shRNA-transfizierten Neuronen unverändert (Abbildung 4.37A).

Zur genaueren Untersuchung der Dendritenkomplexität wurde die Gesamtzahl dendritischer Endverzweigungen pro Neuron mit einer Länge von über $8 \mu\text{m}$ bestimmt [140]. Die dendritischen Bäume der LPP1/1a-shRNA-transfizierten Neurone ($15,0 \pm 0,6$) unterschieden sich in ihrer Komplexität nicht signifikant von den Kontroll-shRNA-transfizierten Neuronen

($15,9 \pm 0,7$) ($p=0,819$, ungepaarter Student's t-Test, Abbildung 4.37B). Das bedeutet, dass Neurone mit einem LPP1/1a-Knockdown und einem daraus resultierenden Migrationsstopp in den unteren kortikalen Schichten in der Lage sind, sich morphologisch ihrer Umgebung anzupassen.

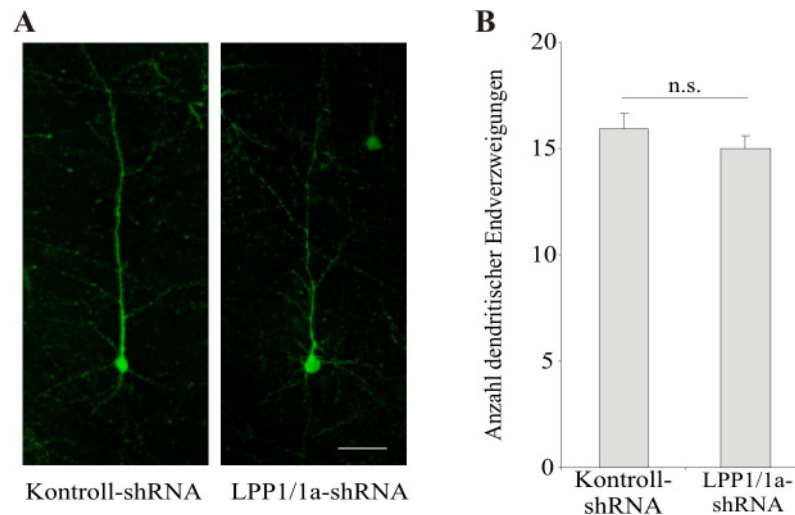


Abbildung 4.37: LPP1/1a-shRNA-transfizierte Neurone in der kortikalen Schicht V sind trotz Migrationsstopp in der Lage, ihre Zellmorphologie der Umgebung anzupassen. Mausembryonen wurden an E13,5 mit LPP1/1a-shRNA oder an E12,5 mit Kontroll-shRNA elektroporiert und an P5 untersucht. (A) Mikroskopische Aufnahmen von einem repräsentativen Kontroll-shRNA-transfizierten Neuron (links) und einem repräsentativen LPP1/1a-shRNA-transfizierten Neuron (rechts) in der kortikalen Schicht V. Zur Verstärkung des GFP-Signals erfolgte eine immunhistochemische Färbung mit einem GFP-Antikörper. Balken: 50 μ m. (B) Quantifizierung der Anzahl dendritischer Endverzweigungen für $n = 48$ Kontroll-shRNA-transfizierte Schicht V-Neurone und $n = 61$ LPP1/1a-shRNA-transfizierte Schicht V-Neurone. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n.s.: nicht signifikant, $p = 0,819$, ungepaarter Students t-Test.

4.2.4.3 Das Radialglianetzwerk ist trotz LPP1/1a-Knockdowns unverändert

Da die mit LPP1/1a-shRNA transfizierten Neurone in den unteren Kortexschichten verbleiben, sollte im Folgenden untersucht werden, ob es Veränderungen im Radialglianetzwerk der mit LPP1/1a-shRNA-elektroporierten Gehirne gibt oder ob LPP1/1a-shRNA-transfizierte Neurone während der Migration in der kortikalen Platte eine veränderte Anheftung ans Radialglianetzwerk zeigen. Dazu wurden Embryonen untersucht, die an E13,5 elektroporiert und an E15,5 entnommen wurden. Für diesen Versuch wurde ein früheres Embryonalstadium ausgewählt, da an E18,5 die meisten Kontrollneurone schon die oberen kortikalen Schichten erreicht hatten. An E15,5 migrieren hingegen auch Kontrollneurone noch entlang der Radialgliazellen zu ihrem Bestimmungsort. Zur Darstellung des Radialglianetzwerks in der kortikalen Platte wurde ein Nestin-Antikörper verwendet. Nestin ist ein Intermediärfilamentprotein, das hauptsächlich von Stammzellen des ZNS und dabei auch in den Ausläufern der Radialgliazellen der kortikalen Platte exprimiert wird.

In der Nestinfärbung von E15,5-Gehirnen zeigten sich bei mikroskopischer Betrachtung keine Unterschiede in Dichte, Orientierung oder Morphologie der Radialglia zwischen LPP1/1a-shRNA- und Kontroll-shRNA-elektroporierten Gehirnen. Es zeigte sich jedoch, dass nur sehr wenige mit der LPP1/1a-shRNA transfizierte Neurone bis E15,5 die kortikale Platte erreicht hatten, in den Kontroll-Gehirnen waren dagegen schon ein Teil der GFP-positiven Neurone in die kortikale Platte eingewandert (Abbildung 4.38). Die durch shRNA-Transfektion veränderte neuronale Migration ließ sich also bereits zwischen E13,5 und E15,5 beobachten.

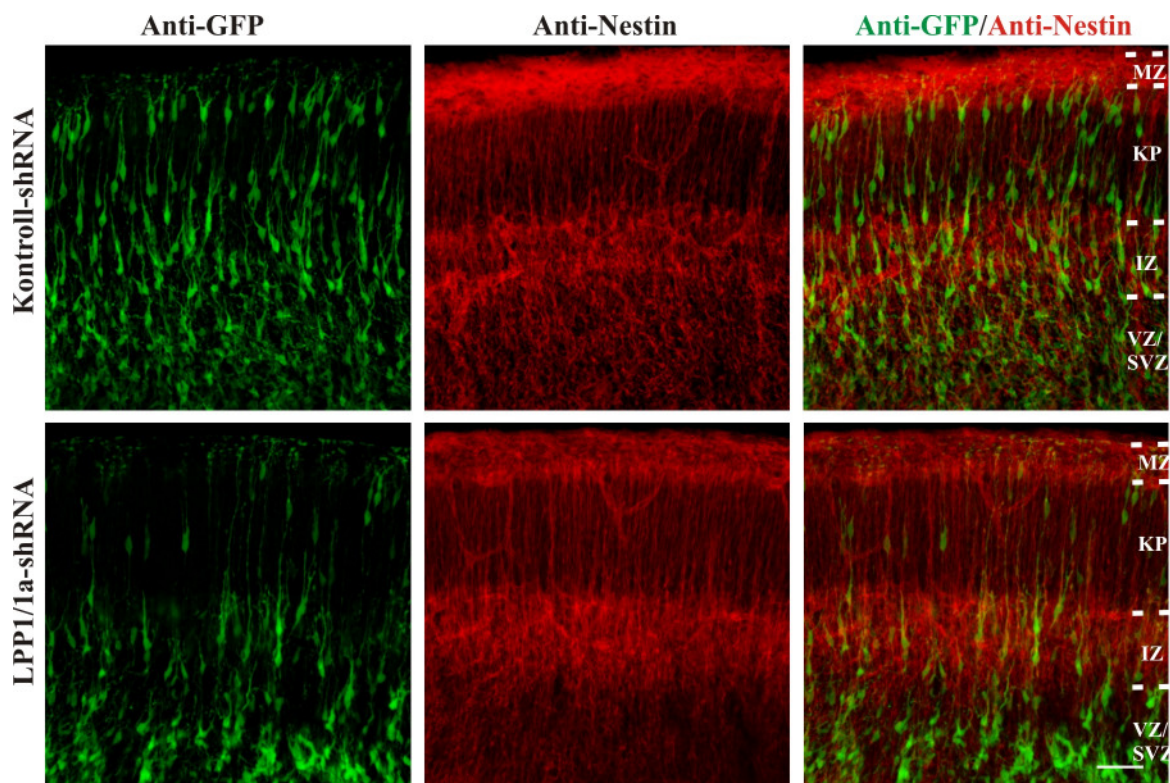


Abbildung 4.38: Das Radialglianetzwerk zeigt sich in LPP1/1a-shRNA-elektroporierten Gehirnen im Vergleich zu den Kontrollen unverändert. Mausembryonen wurden an E13,5 mit LPP1/1a-shRNA (unten) oder Kontroll-shRNA (oben) elektroporiert und an E15,5 zur Untersuchung entnommen. Repräsentative mikroskopische Aufnahmen einer immunhistochemischen Färbung mit Antikörpern gegen GFP (transfizierte Neurone) und Nestin (Radialglianetzwerk). Balken: 50 µm, KP: kortikale Platte, IZ: Intermediärzone, VZ: ventrikuläre Zone; SVZ: subventrikuläre Zone.

4.2.4.4 igrationsstart der Neurone aus der (sub)ventrikulären Zone

Zur genaueren Untersuchung der Lokalisation der transfizierten Zellen an E15,5 wurde der Anteil der LPP1/1a-shRNA- und Kontroll-shRNA-transfizierten Neurone in der (sub)ventrikulären Zone, der Intermediärzone und der kortikalen Platte an E15,5 bestimmt. Zur besseren Unterscheidung der einzelnen Zonen wurden die Zellkerne aller Zellen mit Hoechst-Lösung angefärbt (Abbildung 4.39A).

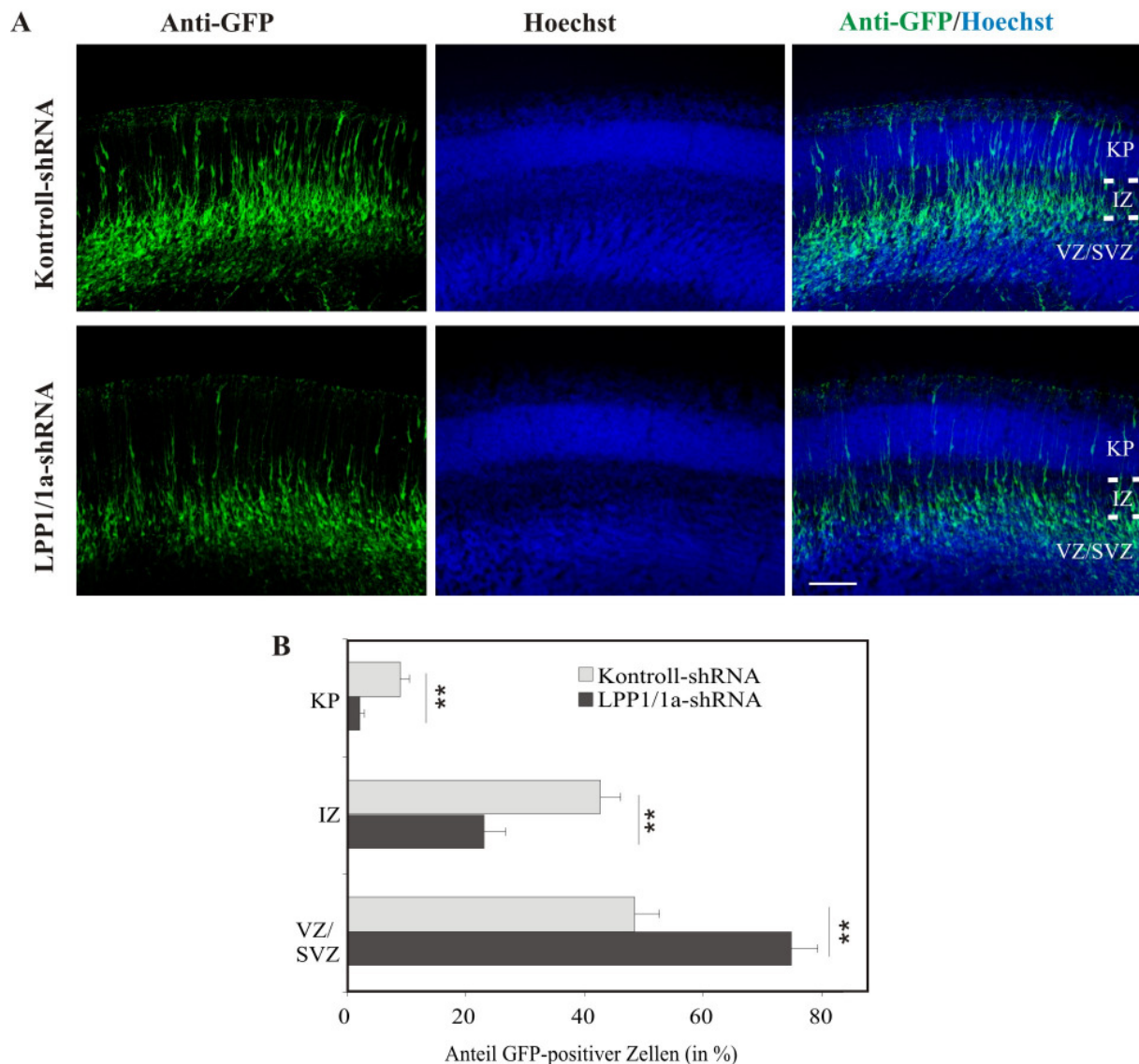


Abbildung 4.39: Die Reduktion von LPP1/1a an E13,5 führt zu einer verspäteten Migration der Neurone aus der (sub)ventrikulären Zone in die Intermediärzone und weiter in die kortikale Platte. (A) Mausembryonen wurden an E13,5 mit Kontroll- (oben) oder LPP1/1a-shRNA (unten) elektroporiert und die Gehirne an E15,5 zur Untersuchung entnommen. Die Färbung transfizierter Zellen erfolgte mit einem GFP-Antikörper. Zellkerne wurden mit Hoechst-Lösung angefärbt. Dargestellt sind repräsentative mikroskopische Aufnahmen. Balken: 100 μ m. **(B)** Zur statistischen Auswertung wurde der Anteil GFP-positiver Zellen für n = 6 LPP1/1a-shRNA-elektroporierte Gehirne und n = 6 Kontroll-shRNA-elektroporierte Gehirne in der kortikalen Platte, der Intermediärzone und der (sub)ventrikulären Zone bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM. **p<0,01, Mann-Whitney-U-Test, KP: kortikale Platte, IZ: Intermediärzone, VZ: ventrikuläre Zone; SVZ: subventrikuläre Zone.

Die statistische Auswertung ergab, dass in den mit LPP1/1a-shRNA-elektroporierten Gehirnen nur 2,1 % der GFP-positiven Zellen an E15,5 die kortikale Platte erreicht hatten. In den Kontroll-shRNA-elektroporierten Gehirnen war der Anteil mit 8,8 % signifikant größer (Abbildung 4.39B, Mann-Whitney-U-Test, p = 0,007). Darüber hinaus war der Anteil der Zellen, die die (sub)ventrikuläre Zone verlassen hatten und bereits in die Intermediärzone

eingewandert waren, in den Kontroll-shRNA-elektroporierten Gehirnen mit 42,6 % ebenfalls signifikant größer als in den LPP1/1a-shRNA-elektroporierten Gehirnen mit nur 22,9 % (Abbildung 4.39B, Mann-Whitney-U-Test, $p = 0,007$). In den LPP1/1a-shRNA-elektroporierten Gehirnen war der größte Anteil der GFP-positiven Zellen mit 75,0 % noch in der (sub)ventrikulären Zone lokalisiert. Im Gegensatz dazu waren in den Kontroll-shRNA-Gehirnen mit 48,5 % nur noch knapp die Hälfte der Zellen in dieser Region zu finden (Abbildung 4.39B, Mann-Whitney-U-Test, $p = 0,007$).

LPP1/1a-shRNA-transfizierte Neurone exprimierten genauso wie die Kontroll-shRNA-Neurone sowohl in der oberen und unteren kortikalen Platte als auch in der Intermediärzone den neuronalen Marker Tuj1 (Abbildung 4.40). Weder die Kontroll- noch die LPP1/1a-shRNA-transfizierten Neurone in diesen Schichten waren mit Nestin-positiven Radialgliazellen kolokalisiert. (Abbildung 4.41). Der Knockdown von LPP1 und -1a zwischen E13,5 und E15,5 beeinflusste also die Migration der Zellen aus der (sub)ventrikulären Zone in die Intermediärzone und weiter in die kortikale Platte, die neuronale Identität der Zellen blieb davon aber unbeeinflusst.

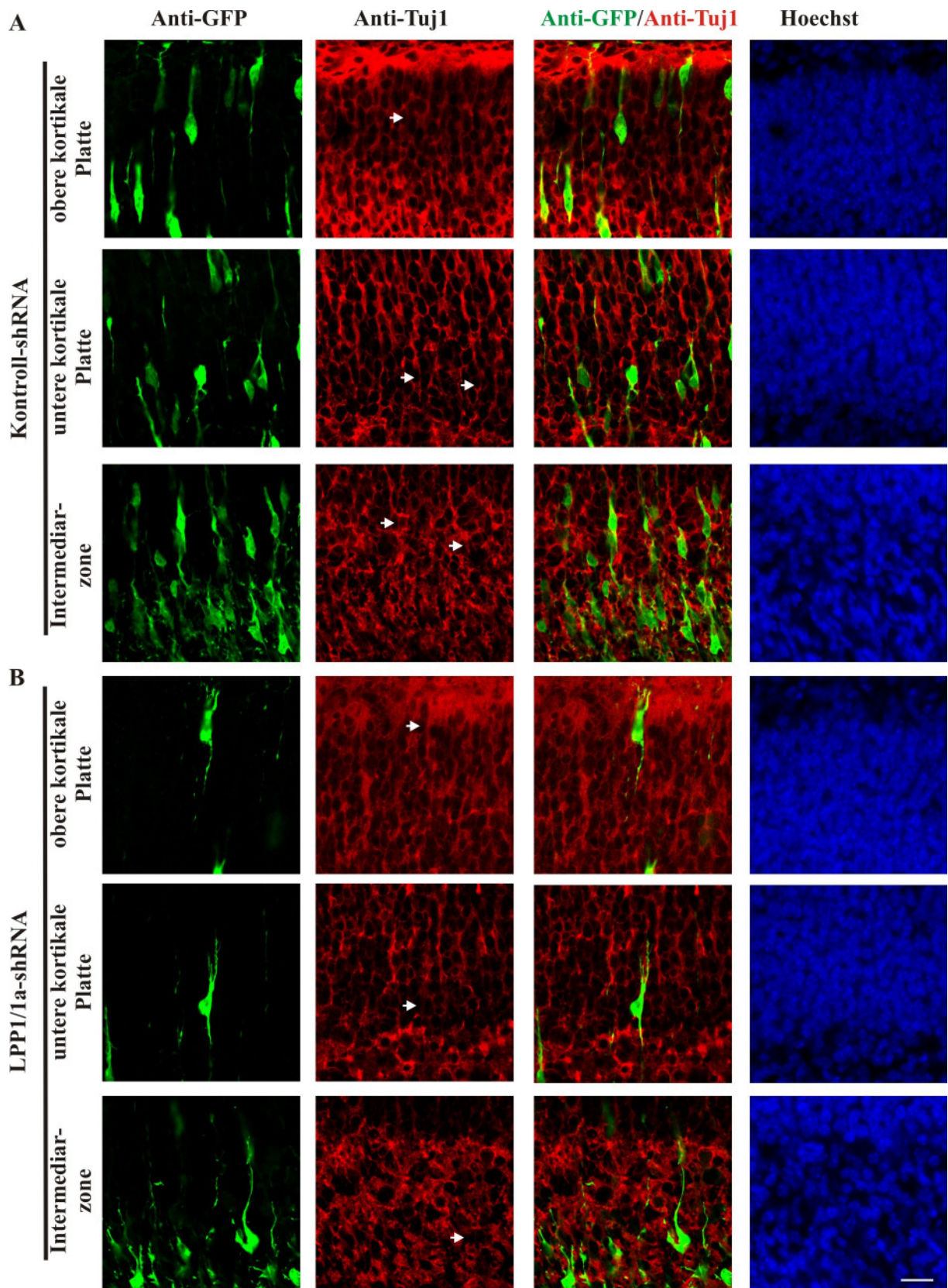


Abbildung 4.40: Transfizierte Zellen in der Intermediärzone und der kortikalen Platte besitzen an E15,5 eine neuronale Identität. Mausembryonen wurden an E13,5 mit Kontroll- (A) oder LPP1/1a- (B) shRNA elektroporiert und an E15,5 zur Untersuchung entnommen. Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen immunhistochemischer Färbungen mit Anti-GFP und Anti-Tuj1 als Marker für postmitotische Neurone der Intermediärzone sowie der unteren und oberen kortikalen Platte. Die Zellkerne wurden mit Hoechst-Lösung angefärbt. Pfeile markieren GFP-positive Zellen in der Tuj1-Färbung. Balken: 20 μ m.

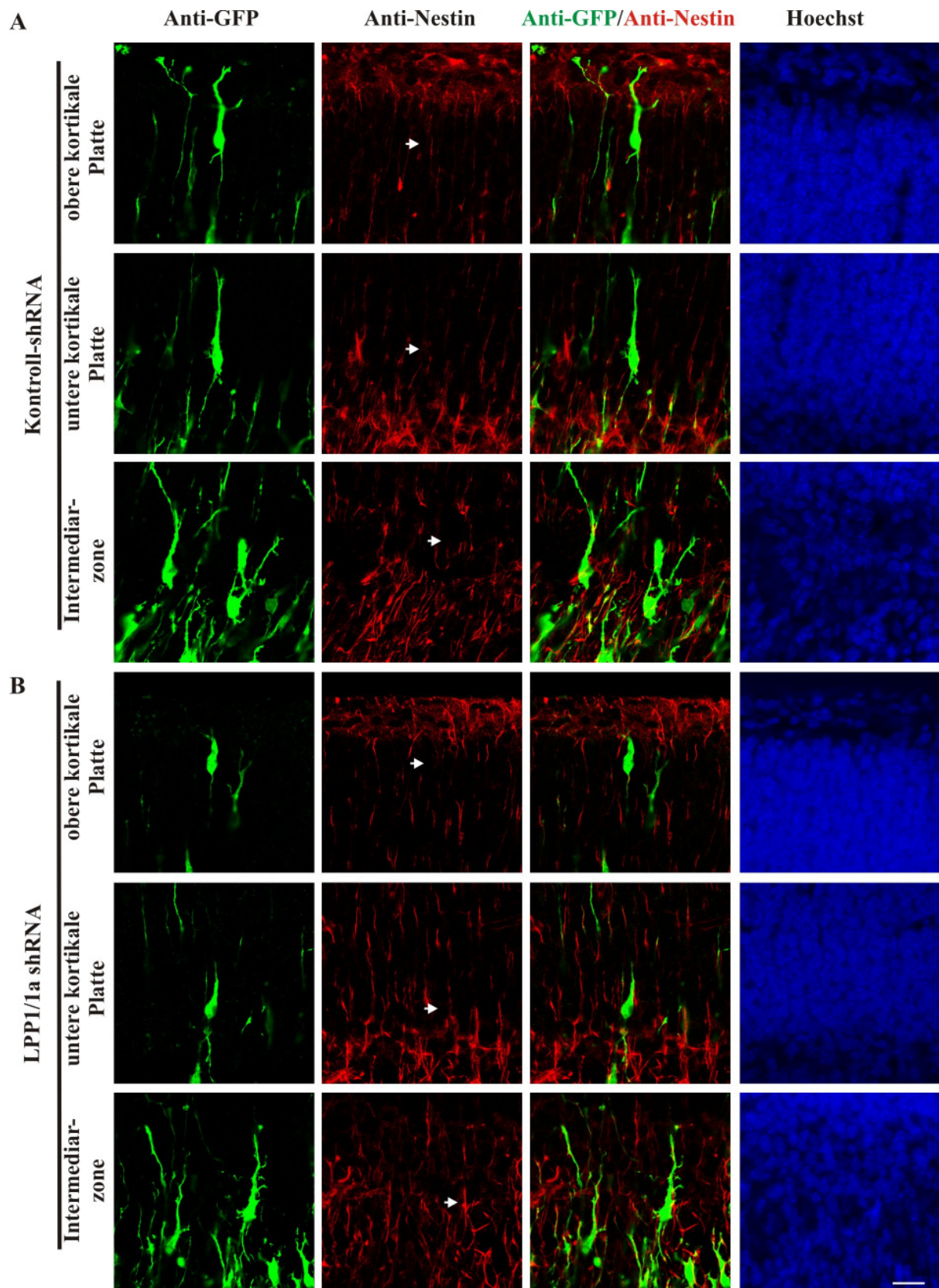


Abbildung 4.41: Transfizierte Zellen weisen keine Kolo­kalisation mit Radialgliazellen auf. Mausem­bryonen wurden an E13,5 mit Kontroll- (A) oder LPP1/1a- (B) shRNA elektro­poriert und an E15,5 entnommen. Repräsen­tative konfokalmikroskopische Aufnahmen der Intermediärzone sowie der oberen und unteren kortikalen Platte von immun­histochemischen Färbungen mit Anti-GFP (transfizierte Zellen) und Anti-Nestin (Radialgliazellen). Die Zellkerne wurden mit Hoechst-Lösung ange­färbt. Pfeile markieren Stellen in der Nestin-Färbung, an denen GFP-positive Zellen lokalisiert sind. Balken: 20 µm.

4.2.4.5 Einfluss auf Zellzyklus und Proliferation neuronaler Vorläuferzellen

In der Vergangenheit ist gezeigt worden, dass LPA die Proliferation und den Zellzyklus beeinflussen kann [58, 71] und auch LPPs, insbesondere LPP2, an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt sein können [141]. Deshalb sollte im Folgenden untersucht werden, ob den in der vorliegenden Arbeit beobachteten Störung der radialen Kortexamigration ebenfalls eine Veränderung der Zellproliferation bzw. des Zellzyklus zugrunde liegt. Hierzu wurden Embryonen an E13,5 elektroporiert. Vierundzwanzig Stunden danach wurde 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) injiziert und die Embryonen weitere zwei Stunden später zur Analyse entnommen. Bei BrdU handelt es sich um ein Thymidinanalogon, das während der Synthesephase des Zellzyklus (S-Phase) kompetitiv in die DNA inkorporiert wird und anschließend mit einem BrdU-Antikörper immunchemisch nachgewiesen werden kann [142]. Mittels BrdU-Färbung können alle neuronalen Vorläuferzellen und deren Tochterzellen identifiziert werden, die sich zu Zeitpunkt der BrdU-Injektion bzw. kurz danach in der S-Phase befunden haben. Der Anteil BrdU-positiver Zellen an allen GFP-positiven Zellen in der ventrikulären Zone war in LPP1/1a- (42,8 % \pm 2,5) und Kontroll-shRNA-elektroporierten Gehirnen (44,2 % \pm 4,7) vergleichbar ($p > 0,999$, Mann-Whitney-U-Test; Abbildung 4.42A/B). Der LPP1/1a-Knockdown beeinflusste die Proliferation der neuronalen Vorläuferzellen also nicht.

Da neben der Proliferationsrate auch der Anteil oder die Lokalisation der neuronalen Vorläuferzellen in der Mitosephase (M-Phase) nach Transfektion mit LPP1/1a-shRNA verändert sein könnte, wurden die an E13,5 elektroporierten und an E14,5 entnommenen Gehirne ebenfalls mit einem Phospho-Histon-H3-Antikörper (Phospho-H3) gefärbt. Phospho-H3 ist ein Marker für sich teilende Zellen in der M-Phase des Zellzyklus. Neuronale Vorläuferzellen, die sich in der M-Phase befinden, waren sowohl in den LPP1/1a-shRNA-elektroporierten Gehirnen als auch in den Kontrollen größtenteils am Boden der ventrikulären Zone lokalisiert (Abbildung 4.42C). Darüber hinaus unterschied sich auch der Anteil der Phospho-H3-positiven Zellen in der ventrikulären Zone zwischen beiden Gruppen nicht (Kontroll-shRNA: 8,8 % \pm 1,6, LPP1/1a-shRNA: 8,5 % \pm 1,1; $p = 0,807$, Mann-Whitney-U-Test; Abbildung 4.42D). Der LPP1/1a-Knockdown hatte also keinen Einfluss auf den Zellzyklus bzw. die Lokalisation oder den Anteil der Zellen in der M-Phase.

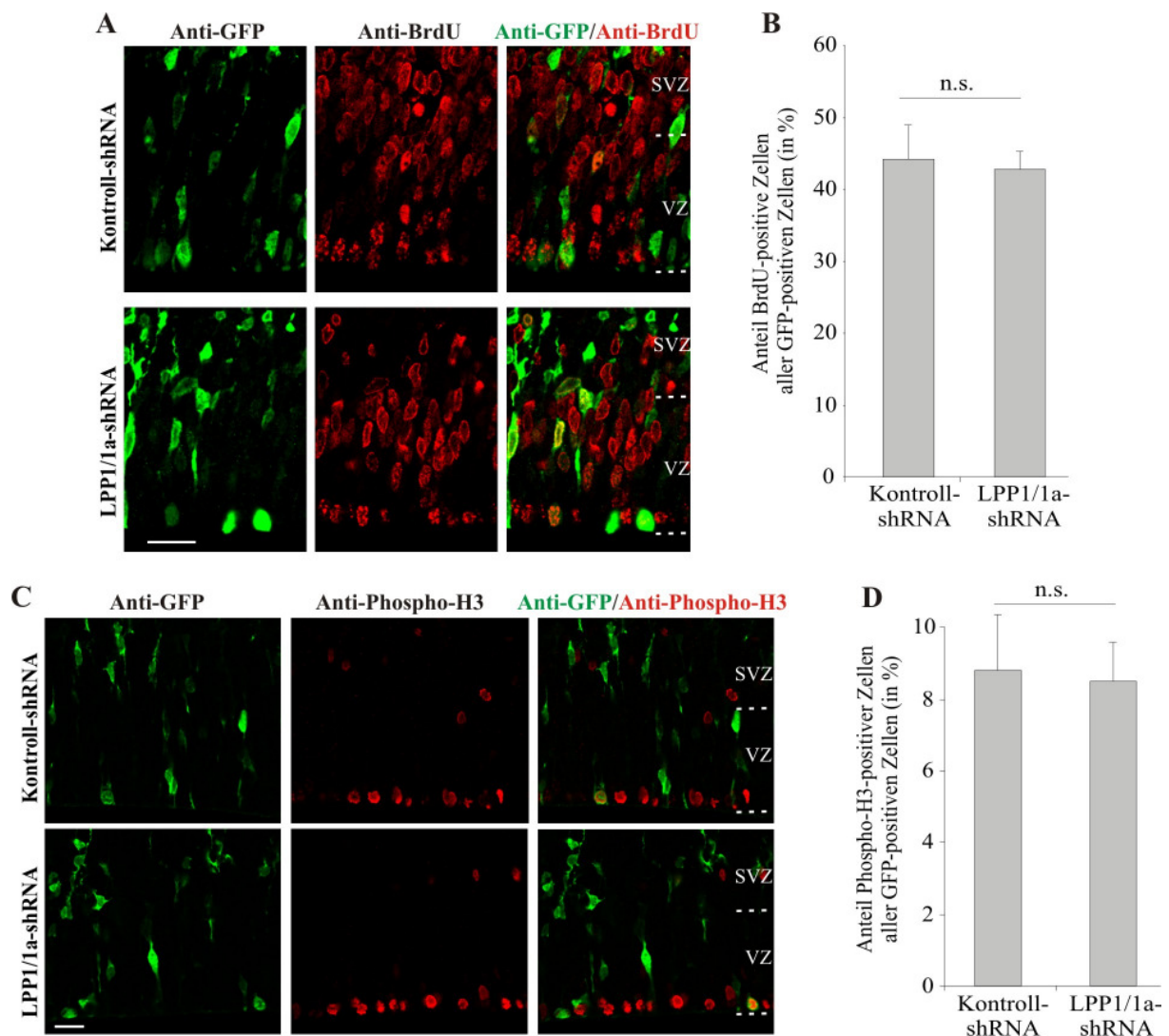


Abbildung 4.42: Der Knockdown von LPP1/1a hat keinen Einfluss auf die Proliferationsrate und den Anteil neuronaler Vorläuferzellen in der M-Phase. Embryonen wurden an E13,5 mit Kontroll- oder LPP1/1a-shRNA elektroporiert. BrdU wurde der Mutter 24 Stunden nach Elektroporation injiziert und die Embryonen weitere zwei Stunden danach zur Untersuchung entnommen. **(A)** Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen einer immunhistochemischen Färbung mit Anti-GFP und Anti-BrdU. Balken: 20 μ m. **(B)** Zur statistischen Auswertung wurde der Anteil der BrdU-positiven Zellen an allen GFP-positiven Zellen in der ventrikulären Zone für n = 4 Kontroll-shRNA-elektroporierte Gehirne und n = 5 LPP1/1a-shRNA-elektroporierte Gehirne bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n.s.: nicht signifikant, Mann-Whitney-U-Test. **(C)** Die Färbung von neuronalen Vorläuferzellen in der M-Phase erfolgte mittels Anti-Phospho-H3. Dargestellt sind repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen. Balken: 20 μ m. **(D)** Zur Quantifizierung wurde der Anteil der Phospho-H3-positiven Zellen an allen GFP-positiven Zellen in der ventrikulären Zone für n = 4 Kontroll-shRNA-elektroporierte Gehirne und n = 5 LPP1/1a-shRNA-elektroporierte Gehirne bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n.s.: nicht signifikant, Mann-Whitney-U-Test. VZ: ventrikuläre Zone, SVZ: subventrikuläre Zone.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Knockdown von LPP1 und -1a in neuronalen Vorläuferzellen in der frühen Kortextentwicklung einen verspäteten Start der radialen Kortextmigration dieser Zellen verursacht. Weiterhin führt der LPP1/1a-Knockdown zu einem Migrationsstopp dieser Neurone in den unteren kortikalen

Schichten. Das Radialgliazellnetzwerk, die neuronale Identität der transfizierten Zellen, die Proliferation und der Zellzyklus bleiben davon aber unberührt. LPP1/1a-shRNA-transfizierte Neurone waren darüber hinaus sogar in der Lage, sich morphologisch ihrer Umgebung anzupassen.

5 Diskussion

Die Funktion des ZNS ist abhängig vom komplexen Aufbau neuronaler Netzwerke. Während der Entwicklung dieser Netzwerke spielen eine Reihe zellulärer Vorgänge wie Proliferation, Migration und neuronale Differenzierung eine entscheidende Rolle, an denen eine Vielzahl intrinsischer und extrinsischer Faktoren beteiligt sind. Zunehmend gibt es Hinweise dafür, dass auch Phospholipide einen Einfluss auf die Entwicklung und Funktion des ZNS besitzen [64]. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit am Beispiel von PRG3 bzw. LPP1 und -1a die Expression und potenzielle Funktion von Proteinen der Lipidphosphatase/Phosphotransferase-Familie (LPT-Familie) untersucht, die den Phospholipidstoffwechsel regulieren.

5.1 PRG3

PRG3 gehört zu einer Familie von Membranproteinen, die vor einigen Jahren im Rahmen einer Untersuchung zur Identifikation von Proteinen entdeckt wurden, die an Regenerationsprozessen im ZNS beteiligt sind. Die Expression und Funktion von PRG3 ist bisher nur bruchstückhaft untersucht und diese Untersuchungen kommen darüber hinaus zu inkonsistenten mRNA- und Proteinexpressionsdaten [103, 107].

5.1.1 Glykosylierung von PRG3

Da einige, aber nicht alle Mitglieder der LPT-Familie eine funktionelle Glykosylierungssequenz auf der zweiten extrazellulären Schleife aufweisen [80, 91, 111, 112], wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob auch PRG3 N-glykosyliert wird. Bei der Glykosylierung von Proteinen handelt es sich um eine weit verbreitete Art der posttranslationalen Modifikation. Mehr als die Hälfte aller eukaryotischen Proteine sind Glykoproteine, von denen wiederum ca. 90 % N-glykosyliert sind [143]. N-Glykosylierungen spielen eine entscheidende Rolle bei Synthese, Faltung, Transport und Stabilität von Membranproteinen [115]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl rekombinantes als auch endogenes PRG3 N-glykosyliert wird (Abbildung 4.3). Eine O-Glykosylierung konnte hingegen nicht nachgewiesen werden (Abbildung 4.6). Durch Analysen *in silico* und anschließende gezielte Punktmutation von PRG3 konnte die N-Glykosylierungsstelle am Asparagin 163 auf der zweiten extrazellulären Schleife lokalisiert werden (Abbildung 4.4). Diese Aminosäuresequenz auf der zweiten extrazellulären Schleife

ist bereits bei anderen Mitgliedern der LPT-Familie als N-Glykosylierungsstelle beschrieben [80, 85].

5.1.2 PRG3-induzierte Filopodienbildung

Funktion der Glykosylierung in der PRG3-induzierten Filopodienbildung

PRG3 induziert eine Zunahme Aktin-reicher dynamischer Filopodien in verschiedenen Zelllinien [103, 107]. Nach Mutation der N-Glykosylierungsstelle von Asparagin zu Glutamin im Rahmen dieser Arbeit war 3xFLAG-rPRG3 N163Q im Gegensatz zu Wildtyp-3xFLAG-rPRG3 nicht in der Lage, diese Filopodienbildung in HEK293-Zellen zu induzieren. Außerdem war PRG3 nach Mutation des Asparagin 163 nicht mehr in der Plasmamembran lokalisiert (Abbildung 4.5). Dies zeigt, dass die N-Glykosylierung am Asparagin 163 für den Transport von PRG3 in die Plasmamembran notwendig ist. Diese Ergebnisse passen sehr gut zu Untersuchungen zur Herstellung einer enzymatischen Aktivität von PRG3, bei denen Aminosäuren in der zweiten und dritten extrazellulären Schleife von PRG3 zu den in enzymatisch-aktiven Mitgliedern der LTP-Familie konservierten Aminosäuren mutiert wurden. Nach Mutation dieser Aminosäuren (Serin 198, Histidin 200 oder Arginin 246) war PRG3 intrazellulär und nicht mehr in der Plasmamembran lokalisiert. Auch diese PRG3-Mutanten waren nicht mehr in der Lage, eine vermehrte Filopodienbildung zu induzieren, was zeigt, dass neben der N-Glykosylierung noch weitere Faktoren für die Plasmamembranlokalisation und die vermehrte Filopodienbildung entscheidend sind [107]. Die Lokalisation von PRG3 in der Plasmamembran scheint also für die PRG3-induzierte Ausbildung von Filopodien notwendig zu sein. Dies wäre unter Umständen dadurch zu erklären, dass die Filopodienbildung die Interaktion von PRG3 mit einem extrazellulären Faktor erfordert, die wiederum nur erfolgen kann, wenn PRG3 in der Plasmamembran lokalisiert ist.

PRG3-induzierte Veränderungen der Zellmorphologie in primären Neuronen

Die durch PRG3-Überexpression induzierte Ausbildung von Filopodien auf der gesamten Zelloberfläche, wie sie in unterschiedlichen Zelllinien auftritt, war in primären hippocampalen Neuronen unter den in dieser Arbeit eingesetzten Versuchsbedingungen nicht zu beobachten (Abbildung 4.13). Das könnte unterschiedliche Ursachen haben. Zum einen kann es sein, dass die PRG3-Überexpression in Zelllinien, die wie z.B. N1E-115-Zellen endogen kein PRG3 exprimieren (Daten nicht gezeigt), Signalkaskaden aktiviert, die unter physiologischen Bedingungen in Zellen mit endogener PRG3-Expression nicht aktiviert

werden würden. Zum anderen könnte es sein, dass Versuchsbedingungen wie Transfektionszeitpunkt und Kulturdauer der primären Neurone optimiert werden müssten, um morphologische Effekte hervorzurufen, da primäre Neurone in unterschiedlichen Differenzierungsstadien unter Umständen unterschiedlich auf eine PRG3-Überexpression reagieren. Es könnte auch sein, dass ein potenzieller Effekt der PRG3-Überexpression innerhalb der heterogenen Neuronenpopulation weniger deutlich ausfällt als in morphologisch homogenen Zelllinien. Hierbei muss auch beachtet werden, dass eine PRG3-Überexpression in hoch polarisierten Zellen wie primären Neuronen, die ein Axon und mehrere, oft stark verzweigte Dendriten besitzen, unter Umständen andere morphologische Veränderungen hervorruft als die vermehrte Ausbildung von Filopodien wie sie in unpolarisierten Zelllinien beobachtet wird. Zum Beispiel könnte es in primären Neuronen durch PRG3-Überexpression auch zu einer Änderung des Verzweigungsgrades von Axon oder Dendriten oder einer veränderten neuronalen Polarität kommen, da dies wie z.B. die Ausbildung von Filopodien Prozesse sind, bei denen unter anderem eine Modulation des Zytoskeletts stattfindet [107, 144]. All das bedeutet, dass erst durch gezielte statistische Analysen nach Optimierung aller Versuchsbedingungen ein Effekt der PRG3-Überexpression auf die Morphologie primärer hippocampaler Neurone ausgeschlossen werden könnte.

5.1.3 PRG3-Expression

PRG3-Gewebe-Expression

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur PRG3-Expression ergaben, dass es sich bei PRG3 um ein weitgehend gehirnspezifisch exprimiertes Protein handelt. Mittels quantitativer Real-time RT-PCR wurde die stärkste *PRG3*-mRNA-Expression im Gehirn detektiert. Außerdem konnten wesentlich geringere *PRG3*-Niveaus in Niere, Leber und Hoden nachgewiesen werden (Abbildung 4.7). Die Ergebnisse dieser Untersuchung stimmen mit Northern Blot-Analysen an adulten Rattengewebe von Savaskan et al. überein, in denen neben einer sehr starken *PRG3*-Expression im Gehirn deutlich schwächere Signale in Niere, Leber und Hoden zu beobachten waren [103]. In weiteren Geweben konnte weder in der im Rahmen dieser Arbeit erfolgten quantitativen Real-time RT-PCR noch im Northern Blot von Savaskan et al. eine *PRG3*-Expression nachgewiesen werden.

Auf Proteinebene konnte eine PRG3-Expression ausschließlich im Gehirn nachgewiesen werden (Abbildung 4.8). Die Analyse erfolgte mit beiden PRG3-spezifischen Antikörpern und kam zu identischen Ergebnissen. Im Gegensatz dazu fanden Sigal et al. eine endogene Expression von PRG3-Protein in allen untersuchten Mausegeweben [107]. Die stärkste

Expression trat hierbei in Milz, Niere und Lunge auf. In Gehirn, Herz und Leber war die PRG3-Expression deutlich geringer. Es ist unwahrscheinlich, dass die unterschiedlichen Proteinexpressionsdaten auf Altersunterschiede der Mäuse zurückzuführen sind, da in der vorliegenden Arbeit mit den verwendeten Antikörpern weder an P5 noch an P30 eine PRG3-Proteinexpression außerhalb des Gehirns nachweisbar war. Die Unterschiede der beiden Studien sind wahrscheinlich auf die Verwendung unterschiedlicher Antikörper zurückzuführen. Da es keine kommerziell erhältlichen, geeigneten PRG3-Antikörper gibt, wurden sowohl von Sigal et al. als auch im Rahmen dieser Arbeit polyklonale Antikörper generiert [107]. Allerdings unterscheidet sich die Sequenz der zur Herstellung der Antikörper verwendeten Peptide. Während Sigal et al. die Aminosäuren 283 – 297 als immunogenes Peptid einsetzten [107], wurden die PRG3-Antikörper 53 und 296 unter Verwendung der Aminosäuren 53 – 66 aus der ersten extrazellulären Schleife bzw. 296 – 309 aus dem C-Terminus von PRG3 als immunogenes Peptid hergestellt. Im Hinblick auf die Spezifität des Antikörpers von Sigal et al. ist auffällig, dass dieser Antikörper in Geweben PRG3-Protein detektiert, in denen nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht einmal *PRG3*-mRNA existiert, wie es z.B. in der Milz der Fall ist [107]. Beide in der hier vorliegenden Arbeit eingesetzten Antikörper wurden als spezifisch im Immunblot charakterisiert (Kapitel 4.1.1.2), führten stets zu identischen Ergebnissen und nur dort, wo auch eine *PRG3*-mRNA-Expression nachgewiesen werden konnte, wurde auch PRG3-Protein detektiert (Abbildung 4.7 und Abbildung 4.8). Damit spricht vieles dafür, dass die mit diesen Antikörpern gewonnenen Resultate der tatsächlichen PRG3-Expression entsprechen. Es ist also wahrscheinlich, dass PRG3-Protein weitgehend gehirnspezifisch und nicht wie von Sigal et al. gezeigt ubiquitär exprimiert wird.

Trotz geringer *PRG3*-mRNA-Expression in Niere, Leber und Hoden konnte auf Proteinebene kein PRG3 nachgewiesen werden (Abbildung 4.8). Das kann unterschiedliche Ursachen haben. Zahlreiche Studien zu diesem Thema belegen eine häufig sehr schwache Korrelation zwischen mRNA- und Proteinexpression [145-148]. Diskrepanzen zwischen mRNA- und Proteinexpression können zum einen durch posttranskriptionelle, translationale und posttranslationale Mechanismen verursacht werden. Während die mRNA-Expression die Transkriptions- bzw. RNA-Degradationsrate widerspiegelt, wird das Proteinniveau zusätzlich durch posttranskriptionale, translationale und posttranslationale Mechanismen wie z.B. die Degradationsrate des Proteins beeinflusst [147-150]. Das könnte bedeuten, dass die in Niere, Leber und Hoden detektierte *PRG3*-mRNA wesentlich langsamer oder gar nicht in PRG3-Protein translatiert wird oder dass PRG3-Protein in diesen Geweben im Vergleich zum

Gehirn eine wesentlich geringere Halbwertszeit besitzt. Andererseits können die Unterschiede zwischen mRNA- und Proteinexpression auf die unterschiedliche Sensitivität der verwendeten Methoden zurückzuführen sein [146, 148]. Bei der in dieser Arbeit zur Quantifizierung der mRNA-Expression verwendeten quantitativen Real-time RT-PCR handelt es sich um ein sehr sensitives Verfahren, bei dem noch sehr geringe mRNA-Mengen nachgewiesen werden können, während der Immunblot ein wesentlich weniger sensitiver Proteinnachweis ist. Eine sehr geringe PRG3-Proteinmenge in Niere, Hoden und Leber könnte im Immunblot deshalb unter Umständen nicht detektiert worden sein.

Zelltypspezifische PRG3-Expression

Auf zellulärer Ebene wurde PRG3 wesentlich stärker in primären Neuronen als in nicht-neuronalen Zellen wie primären Astrozyten oder Mikroglia exprimiert (Abbildung 4.11). Erneut zeigte die quantitative Real-time RT-PCR eine geringe PRG3-Expression in Astrozyten und Mikroglia, die auf Proteinebene nicht nachweisbar war. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich ebenfalls an der geringeren Sensitivität des Immunblots oder ist auf unterschiedliche posttranskriptionelle, translationale oder posttranslationale Mechanismen zurückzuführen. Für eine weitgehend Neuronen-spezifische PRG3-Expression spricht auch die starke PRG3-Expression während der neuronalen Differenzierung embryonaler Mausstammzellen (mESZ) der Zelllinie D3 (Abbildung 4.12).

Undifferenzierte mESZ bzw. differenzierte Kardiomyozyten exprimierten PRG3 nur in sehr geringen Mengen. Im Laufe der neuronalen Differenzierung der mESZ stieg die PRG3-Expression jedoch auf das bis zu 100-fache im Vergleich zu undifferenzierten mESZ an (Abbildung 4.12). Als Marker für die neuronale Differenzierung der mESZ wurde *tuj1* verwendet. PRG3 spielt also bei der Differenzierung undifferenzierter mESZ in Neurone eine Rolle. Aufgrund der weitgehend neuronenspezifischen Expression könnte PRG3 ebenfalls wie *tuj1* als neuronaler Differenzierungsmarker verwendet werden. Da die PRG3-Expression im Laufe der neuronalen Differenzierung weiter zunimmt, scheint PRG3 unter Umständen sogar eine Auskunft über den Differenzierungsgrad der Neurone anhand des Expressionsniveaus zuzulassen. Für eine Rolle von PRG3 in der neuronalen Differenzierung spricht auch, dass die Zelllinien N1E-115 (Neuroblastomzellen) und NSC-34 (Fusion aus Rückenmarkszellen mit Neuroblastomzellen), bei denen es sich um undifferenzierte, entartete neuronale Vorläuferzellen handelt, endogen kein PRG3 exprimieren (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Tatsache wurden in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich primäre Neurone als

Modellsystem für weitere Untersuchungen an PRG3 verwendet, da diese endogen PRG3 exprimieren.

PRG3-Expression während der Entwicklung

Während der Entwicklung konnte eine PRG3-Expression bereits ab E14 bzw. E16 nachgewiesen werden. Die stärkste PRG3-mRNA-Expression trat in allen untersuchten Gehirnregionen (Hippocampus, Kortex, Cerebellum und Bulbus olfaktorius) in späten embryonalen bzw. frühen postnatalen Stadien auf (Abbildung 4.9). Auf Proteinebene konnte die stärkste PRG3-Expression zeitlich versetzt in frühen postnatalen Stadien gezeigt werden. Danach nahm sie bis P30 bzw. P60 stark ab (Abbildung 4.10). Diese Ergebnisse stimmen mit *in situ* Hybridisierungsstudien überein, in denen das PRG3-Signal und somit die PRG3-Expression während der postnatalen Entwicklung deutlich abnimmt [103, 106]. Die dynamische Expression von PRG3 während der Entwicklung mit der stärksten Expression in späten embryonalen und frühen postnatalen Stadien könnte ein weiterer Hinweis dafür sein, dass PRG3 während der neuronalen Entwicklung eine Rolle spielt wie z.B. bei der Differenzierung, dem Auswachsen oder der Wegfindung von Axonen oder Dendriten.

5.1.4 Intrazelluläre Lokalisation von PRG3 in primären Neuronen

Lokalisation von überexprimiertem PRG3

Bisherige Untersuchungen der intrazellulären Lokalisation von PRG3 wurden mit Hilfe von Fusionsproteinen in neuronalen und nicht-neuronalen Zelllinien wie N1E-115, Cos7 oder HeLa vorgenommen. Hierbei war GFP-PRG3 sowohl in der Plasmamembran als auch in intrazellulären Membranstrukturen, wahrscheinlich dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Komplex, lokalisiert [103, 107]. Da N1E-115-Zellen endogen kein PRG3 exprimieren und es sich bei den Nierenzellen Cos7 und den Zervixkarzinomzellen HeLa sogar um nicht-neuronale Zelllinien handelt, wurde die intrazelluläre Lokalisation nach Überexpression von PRG3 in primären Neuronen untersucht, da in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass es sich bei PRG3 um ein weitgehend Neuronen-spezifisch exprimiertes Protein handelt (Kapitel 4.1.3). Die Differenzierung von Neuronen *in vitro* kann in fünf Stadien gegliedert werden, in denen Neuriten vom Soma auswachsen und in ein Axon und mehrere Dendriten differenzieren (Kapitel 1.1.2) [10, 12]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in frisch isolierte hippocampale Neurone transfiziertes GFP-mPRG3 nach zwei Tagen in Kultur deutlich in der Plasmamembran der Neurone lokalisiert

war. Darüber hinaus war GFP-mPRG3 in intrazellulären Kompartimenten zu finden. Diese Lokalisation stimmt mit den Ergebnissen an oben genannten Zelllinien überein (Abbildung 4.13) [103, 107].

Lokalisation von endogenem PRG3 in jungen primären Neuronen

Da sich die intrazelluläre Lokalisation überexprimierter Fusionsproteine von der des endogenen Proteins, insbesondere in polarisierten Zellen wie Neuronen, unterscheiden kann, wurden primäre hippocampale Neurone immunzytochemisch untersucht. In jungen primären Neuronen nach 1 Tag *in vitro* war endogenes PRG3 in der Plasmamembran aller Neuriten lokalisiert (Abbildung 4.14). Zu diesem Zeitpunkt besaßen die Neurone noch mehrere undifferenzierte Ausläufer gleicher Länge (Stadium 2). Im Vergleich zur Überexpression von GFP-PRG3 (Abbildung 4.13) war endogenes PRG3 deutlich schwächer in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert. Der Grund hierfür könnte sein, dass in jeder Zelle nur eine bestimmte Menge eines Membranproteins, oder eine bestimmte Menge an Proteinen im Allgemeinen, in die Plasmamembran integriert werden kann [151, 152]. Darüber hinaus exprimiertes GFP-PRG3 kann dann nicht mehr in die Membran transportiert werden und verbleibt in intrazellulären Kompartimenten [151, 152]. Die im Vergleich zu endogenem PRG3 verstärkte intrazelluläre Lokalisation könnte aber auch durch eine unvollständige Prozessierung des Fusionsproteins ausgelöst werden.

Nach 4 Tagen *in vitro* besaßen die primären hippocampalen Neurone bereits ein Axon und mehrere Dendriten (Stadium 4). In diesen Zellen wurde PRG3 ebenfalls in sämtlichen Neuriten, d.h. sowohl im Axon als auch in den Dendriten endogen exprimiert (Abbildung 4.16). Die endogene PRG3-Expression war sowohl nach 1 als auch nach 4 Tagen *in vitro* im Neuritenschaft besonders stark, wohingegen PRG3 in den β -Aktin-positiven Wachstumskegeln kaum zu finden war. In Neuronen übernimmt der hochdynamische Wachstumskegel während der Entwicklung des Nervensystems die Funktion der Führung und Wegfindung wachsender Neuriten. Der stabile Neuritenschaft entsteht dabei durch die sogenannte Konsolidierung des proximalen Wachstumskegels [19, 153]. Bisher wurde die Konsolidierung als ein temporär abgegrenzter Vorgang betrachtet, in dessen Anschluss der Neuritenschaft in ein unstimuliertes passives Stadium übergeht. Im Gegensatz dazu zeigen Studien in anderen Zellsystemen, dass es sich bei der Aufrechterhaltung dieser Zellasymmetrie um einen aktiven Prozess handelt [154, 155]. Neuere Studien kommen zu der Ansicht, dass auch der Neuritenschaft durch eine Art aktive Konsolidierung, bei der das Auswachsen konstant unterdrückt wird, in seiner Form erhalten bleibt [9, 156]. An diesem

Prozess beteiligte Proteine müssen vorzugsweise im Neuritenschaft lokalisiert sein wie z.B. die Kalzium-abhängigen Proteasen Calpain-1 und -2 oder im Neuritenschaft in ihrer aktivierten Form vorliegen wie z.B. die Glykogen Synthase Kinase-3-beta (GSK-3 β). GSK-3 β kommt mit Ausnahme des Wachstumskegels in der gesamten Zelle in aktivierter Form vor [157, 158]. Während Calpaine indirekt die Aktinpolymerisation inhibieren, verhindert aktives GSK-3 β die Verzweigung von Neuriten durch Regulation der Mikrotubuli-Filamente [159] und trägt so aktiv zu einer Konsolidierung des Neuritenschafts bei [9]. Wie die an der aktiven Konsolidierung des Neuritenschafts beteiligten Calpaine ist PRG3 vor allem im Schaft aller Neuriten junger primärer Neurone lokalisiert. In Wachstumskegeln werden Calpaine ebenso wie PRG3 nur schwach exprimiert [9]. Diese räumliche Koexpression legt die Vermutung nahe, dass auch PRG3 in der aktiven Konsolidierung des Neuritenschafts eine Rolle spielt.

Wachstum und Verzweigung von Neuriten im ZNS werden durch zahlreiche extrazelluläre und intrazelluläre Faktoren beeinflusst [15, 160]. Dabei könnte PRG3 ein katalytisch inaktives Homolog der katalytisch aktiven Mitglieder der LPT-Familie sein, dem die für die Katalyse entscheidende Aminosäuresequenzen fehlen, das aber durch konservierte Domänen die Möglichkeit hat, in nicht enzymatischer Art und Weise mit Lipidsubstraten zu interagieren [80]. Solche Funktionen katalytisch inaktiver Proteine mit Homologien zu katalytisch aktiven Proteinen sind bereits für andere Enzymklassen einschließlich Lipid- und Proteinphosphatasen beschrieben [161, 162]. Auf diesem Weg könnte PRG3 nach Stimulation durch extrazelluläre Signale wie z.B. bioaktive Phospholipide in einer Art Rezeptorfunktion intrazelluläre Signalwege aktivieren oder inhibieren und dadurch die Morphologie der Zelle verändern und so zu einer aktiven Konsolidierung des Neuritenschafts beitragen.

Lokalisation von endogenem PRG3 in reifen primären Neuronen

In reifen primären Neuronen nach 14 Tagen in Kultur war eine endogene PRG3-Expression nur noch im Axon und nicht mehr in den Dendriten detektierbar (Abbildung 4.17). Zu diesem Zeitpunkt waren Axon und Dendriten ausgereift (Stadium 5) [10]. Im Laufe der Differenzierung von Neuronen müssen Neuriten entweder eine axonale oder dendritische Identität annehmen. Sowohl die Entstehung als auch die Erhaltung der neuronalen Polarität erfordert eine umfassende Regulation der Zytoskelettproteine [5, 7]. In den letzten Jahren wurden einige Moleküle wie phospho-Akt, das Ras related-Protein Rab-1B (Rap1B), das Cell division control-Protein 42 (Cdc42), das Adenomatous polyposis coli-Protein (APC), das

Collapsin response mediator-Protein-2 (CRMP2) und phospho-GSK-3 β identifiziert, die wie PRG3 ursprünglich in allen Neuriten lokalisiert sind (Stadium 2) und deren Expression sich dann auf einen Neuriten, das zukünftige Axon, beschränkt (Stadium 3) [163-166]. Diese Proteine sind meist an der Entstehung und Erhaltung der neuronalen Polarität beteiligt. Wird ihre Funktion gestört, bilden sie entweder mehrere Axone pro Zelle aus, oder die Ausbildung von Dendriten und Axonen findet gar nicht erst statt [167, 168]. Im Gegensatz zu PRG3, das nach 4 Tagen *in vitro* (Stadium 4) immer noch in sämtlichen Neuriten lokalisiert war und erst in vollständig differenzierten Neuronen nach 14 Tagen *in vitro* (Stadium 5) nur noch axonal nachgewiesen werden konnte, findet die Expressionsverschiebung obiger an der Entstehung der neuronalen Polarität beteiligten Proteine jedoch schon zwischen Stadium 2 und 3 statt. Das lässt vermuten, dass PRG3 nicht maßgeblich an der Entstehung der neuronalen Polarität beteiligt ist, unter Umständen aber in späteren Stadien zu ihrer Erhaltung beiträgt.

PRG3 konnte in reifen primären Neuronen nur in prä- nicht aber in postsynaptischen Strukturen nachgewiesen werden (Abbildung 4.18). Dabei war PRG3 sowohl in GABAergen als auch in glutamatergen Präsynapsen lokalisiert (Abbildung 4.19), was darauf hindeutet, dass PRG3 sowohl von inhibitorischen als auch von exzitatorischen Neuronen benötigt wird.

5.2 LPP1 und -1a

Im Gegensatz zu PRG3 handelt es sich bei LPP1 und -1a um Proteine, die in den letzten Jahren im Hinblick auf ihre biochemischen Eigenschaften genauer untersucht wurden [82, 84]. Da die Expressionsorte, -zeitpunkte und die Funktionen von LPP1 und -1a in neuronalen Zellen bzw. im ZNS noch weitgehend unbekannt sind, sollten diese im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysiert werden.

5.2.1 Einfluss von LPP1 und -1a auf die Neuritenlänge von N1E-115-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl LPP1 als auch -1a in N1E-115-Neuroblastomzellen als auswachs-assoziierte Proteine wirken. Im Gegensatz zu PRG3 konnte für LPP1 und -1a eine endogene Expression in N1E-115-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 4.25). Diese Zelllinie ist also für funktionelle Untersuchungen an LPP1 und -1a mittels Überexpression und RNA-Interferenz (RNAi) geeignet. N1E-115-Zellen, die mit LPP1- oder -1a-Expressionsplasmiden transfiziert wurden, besaßen im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant längere Neuriten (Abbildung 4.24). Da die Überexpression von

Proteinen wie LPP1 und -1a zu einem veränderten Expressionsmuster und nicht-physiologischen Reaktionen der Zellen führen kann [59], wurde zusätzlich die Rolle von endogen in N1E-115-Zellen exprimiertem LPP1 und -1a mittels RNAi untersucht. Dazu wurden sowohl LPP1- oder -1a-spezifische shRNAs aus dem differenziell gespleißten Bereich als auch eine shRNA gegen den gemeinsam gespleißten Bereich von LPP1 und -1a verwendet. Der Knockdown von endogenem LPP1 und -1a zur gleichen Zeit mittels LPP1/1a-spezifischer shRNA führte zu einer starken Verkürzung der Neuriten im Vergleich zu Zellen, die mit der Kontroll-shRNA transfiziert wurden. Die Transfektion von N1E-115-Zellen mit einem shRNA-Plasmid, das spezifisch die Expression jeweils nur einer Spleißvariante verringerte, führte ebenfalls zu einer Verkürzung der Neuriten, auch wenn der Effekt im Vergleich zum Knockdown von LPP1 und -1a zur gleichen Zeit geringer ausfiel (Abbildung 4.27). Da die Behandlung von N1E-115-Zellen mit allen drei verschiedenen shRNAs zu einer Verkürzung der Neuriten führte, kann geschlussfolgert werden, dass es sich hierbei um einen spezifisch durch LPP1- und -1a-Knockdown ausgelösten Effekt handelt und dieser nicht durch einen unspezifischen Knockdown eines anderen Gens (sogenannter off-Target-Effekt) erklärt werden kann. Folglich konnte gezeigt werden, dass LPP1 und -1a für das natürliche Auswachsen von Neuriten in N1E-115-Zellen notwendig sind. Untersuchungen an Motorneuronen von LPP3-Knockout-Mäusen kommen zu vergleichbaren Ergebnissen. Embryonale Stammzellen aus LPP3-Knockout-Mäusen, die *in vitro* zu Motorneuronen differenziert wurden, waren nicht in der Lage, Neuriten auszubilden [169]. Dies könnte darauf hinweisen, dass LPP1 und -1a und LPP3 ähnliche Funktionen in neuronalen Zellen besitzen. Frühere Studien konnten zeigen, dass extrazelluläre Signalmoleküle wie Phospholipide einen Einfluss auf die Zellmorphologie von N1E-115-Zellen haben. Die Zugabe von LPA oder S1P führt zu einem Neuritenkollaps dieser Zellen [74, 170, 171]. Eine Erklärung für die Wirkung von LPP1 und -1a beim Neuritenwachstum von N1E-115-Zellen könnte sein, dass eine verstärkte Expression von LPP1 und -1a zu einem vermehrten Abbau von Phospholipiden in der direkten Umgebung der transfizierten Zelle führt. Dies würde ein verstärktes Auswachsen der Neuriten ermöglichen. Im Gegensatz dazu sind N1E-115-Zellen mit einem Knockdown von LPP1 und/oder -1a und entsprechend verminderter Phospholipid-Degradationsaktivität in der näheren Umgebung der Zellen einem höheren Phospholipidspiegel ausgesetzt. Dies könnte die Ursache dafür sein, dass diese Zellen nicht in der Lage sind, längere Neuriten auszubilden. Da die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche unter serumfreien Bedingungen, d.h. in Abwesenheit von Phospholipiden, stattfanden, kann der hier beobachtete

Effekt nicht durch die enzymatische Degradation extrazellulärer Phospholipide erklärt werden.

Neben der Kontrolle des extrazellulären Phospholipidspiegels sind LPPs ebenfalls in der Lage, den intrazellulären Lipidmetabolismus zu beeinflussen [80, 82, 84]. In Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass LPP1 intrazelluläre Signalwege durch eine Veränderung des intrazellulären Phospholipidspiegels in der Signalkaskade unterhalb der LPA-Rezeptoren bewirken kann [59].

Im Hinblick auf die Induktion des Neuritenwachstums konnten im Rahmen dieser Arbeit in N1E-115-Zellen keine signifikanten Unterschiede zwischen LPP1 und -1a festgestellt werden. Obwohl *LPP1a* in diesen Zellen endogen stärker exprimiert wurde als *LPP1*, führten sowohl die Überexpression als auch der spezifische Knockdown von LPP1 bzw. -1a zu vergleichbaren Effekten. Es wird vermutet, dass die differenziell gespleißte Region für die Substraterkennung oder die Lokalisation innerhalb der Plasmamembran von Bedeutung ist [88, 89], sie scheint aber keine entscheidende Rolle bei dem LPP1- und -1a-vermittelten Auswachsen von Neuriten zu spielen.

5.2.2 Endogene LPP1- und -1a-Expression

LPP1- und -1a-spezifische Antikörper

Da es keine kommerziell erhältlichen LPP1- und/oder -1a-Antikörper gibt, wurden zuerst Spleißvarianten-spezifische Antikörper und ein Antikörper gegen beide Spleißvarianten zusammen aufgereinigt und charakterisiert (Kapitel 4.2.1). Von den untersuchten Antikörpern erlaubte nur der gegen beide Spleißvarianten (Anti-LPP1/1a) eine spezifischen Detektion von LPP1 und -1a. Da sich die beiden Spleißvarianten in ihrer Sequenz nur um ca. 50 Aminosäuren unterscheiden und hiervon ungefähr die Hälfte in der Plasmamembran lokalisiert ist (Abbildung 1.6), blieb nur ein sehr kleiner Bereich, der zum Peptiddesign der Spleißvarianten-spezifischen Antikörper genutzt werden konnte. Anscheinend existieren weitere Proteine, die eine ähnliche Raumstruktur wie die hier verwendeten Peptide aufweisen, sodass eine Spleißvarianten-spezifische Detektion von LPP1- und -1a mit diesen Antikörpern nicht möglich war.

Expression von LPP1 und -1a in Geweben und während der Entwicklung

LPP1a konnte mittels quantitativer Real-time RT-PCR in allen untersuchten Mausegeweben (Gehirn, Thymus, Lunge, Leber, Niere, Milz und Hoden) an P5 und P30 detektiert werden.

Die *LPP1a*-Expression war dabei in allen Geweben stärker als die von *LPP1* (Abbildung 4.28). Da die Amplifikationseffizienz der Assays zur Detektion von *LPP1* bzw. *-1a* in der quantitativen Real-time RT-PCR jeweils bei 98 – 100 % lag, kann die vermehrte Expression von *LPP1a* nicht auf solche Unterschiede zurückzuführen sein. In einigen Geweben wie dem Gehirn oder der Milz war die *LPP1a*-Expression ca. 10-fach stärker als die von *LPP1*. Im Hoden an P30 war der Unterschied sogar noch deutlicher, während in anderen Geweben wie der Niere und der Lunge der Expressionsunterschied beider Spleißvarianten wesentlich geringer war. Das Spleißen der *LPP1*-Prä-mRNAs ist in den unterschiedlichen Geweben also unterschiedlich stark zu Gunsten von *LPP1a* reguliert.

Auch Nanjundan und Possmayer fanden mittels semiquantitativem Southern Blot anhand von cDNA eine Expression von *LPP1* und *-1a* in allen untersuchten Rattengeweben. Allerdings war hier stets die *LPP1*-Expression stärker als die von *LPP1a* [87]. Die Diskrepanz dieser Daten zu den hier vorgestellten erklärt sich wahrscheinlich durch die Verwendung einer weniger sensitiven semiquantitativen Methode (Southern Blot).

Die quantitative Real-time RT-PCR zur Untersuchung der entwicklungsabhängigen Regulation der *LPP1*- und *-1a*-Expression im Mauskortex ergab, dass die Expression während der embryonalen und postnatalen Entwicklung zwischen E14 und P30 kaum reguliert wird (Abbildung 4.29). Auch hier war die *LPP1a*-Expression in allen untersuchten Stadien ca. 10-fach stärker als die von *LPP1*. Während der Entwicklung wird der Spleißprozess im Gehirn folglich nicht reguliert.

Sowohl *LPP1* als auch *-1a* werden auf mRNA-Ebene in allen untersuchten Geweben exprimiert. Der Spleißprozess ist in allen untersuchten Geweben und Entwicklungsstadien zugunsten von *LPP1a* reguliert. Ob *LPP1a* aber auch auf Proteinebene stärker exprimiert wird als *LPP1*, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden, da kein Antikörper zur spezifischen Detektion jeweils nur einer der beiden Spleißvarianten zur Verfügung stand und beide Spleißvarianten ein fast identisches Molekulargewicht besitzen und daher nicht der Größe nach im Immunblot getrennt werden konnten. Da die Korrelation zwischen mRNA- und Proteinexpression häufig nur sehr schwach ist (Kapitel 5.1.3), ist es aufgrund der vorliegenden Daten nicht möglich, verlässliche Aussagen über das Verhältnis der Expression der beiden Spleißvarianten auf Proteinebene zu machen. Falls sich diese Expressionsverhältnisse jedoch in zukünftigen Studien auch auf Proteinebene bestätigen sollten, wäre das auch für die Beurteilung in der Vergangenheit durchgeführter Studien von Bedeutung, da diese häufig ausschließlich *LPP1* berücksichtigen [59, 85, 89, 99]. Es ist

schließlich durchaus möglich, dass dieses Expressionsverhältnis im Rahmen konzertierter Aktionen von LPP1 und -1a funktionell relevant ist.

Neuronale und gliale LPP1- und -1a-Expression

Mittels Anti-LPP1/1a konnte die Protein-Expression beider Spleißvarianten gemeinsam untersucht werden. LPP1- und/oder -1a-Protein konnte in der immunhistochemischen Färbung im Kortex von Mausembryonen an E18,5 nachgewiesen werden (Abbildung 4.30). LPP1 und/oder -1a waren auch in MAP2-positiven Neuronen lokalisiert. Das stimmt mit den Daten der quantitativen Real-time RT-PCR überein, in der eine *LPP1*- und *-1a*-Expression auch in primären Neuronen nachgewiesen werden konnte. Daneben wurden *LPP1* und *-1a* in primären Astrozyten und Mikroglia exprimiert. Im Immunblot war eine Detektion von LPP1 und -1a mittels Anti-LPP1/1a dagegen nicht möglich. Das liegt wahrscheinlich an einer zu geringen endogenen LPP1- und -1a-Konzentration im Gehirn, da LPP1-Protein aus LPP1-transgenen-Mäusen im Immunblot detektiert werden konnte (Abbildung 4.23).

5.2.3 Radiale Kortextmigration von Neuronen mit LPP1/1a-Knockdown

Zur Untersuchung der Funktion von LPP1 und -1a während der Kortextentwicklung wurde ein LPP1/1a-spezifischer shRNA-Knockdown *in utero* durchgeführt. Dieser Knockdown führt zu einer verspäteten Migration der Neurone aus der (sub)ventrikulären Zone in die Intermediärzone und die kortikale Platte. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der LPP1/1a-Knockdown in einem Teil dieser Neuronen zu einem vorzeitigen Migrationsstopp in den unteren Schichten des Kortex führt (Kapitel 4.2.4).

Hinweise auf eine Funktion von LPPs im Zusammenhang mit Zellmigrationsprozessen gibt es aus unterschiedlichen Zellsystemen [82, 84]. In Fibroblasten führt der Knockdown von LPP1 *in vitro* zu einer Zunahme der LPA-induzierten Zellmigration, während die Überexpression von LPP1 das Gegenteil bewirkt [59]. Das widerspricht den Resultaten der vorliegenden Arbeit, was sich wahrscheinlich durch die Verwendung unterschiedlicher Modelle erklären lässt. Bei der in den Versuchen an Fibroblasten untersuchten LPA-induzierten Migration handelt es sich um eine ungerichtete chemokinetische Art der Zellmigration [59], während die radiale Kortextmigration von Neuronen eine gerichtete Bewegung ist. Es wird vermutet, dass hierbei Gradienten unterschiedlicher diffusionsfähiger Faktoren, die Neurone in eine bestimmte Richtung migrieren lassen [55]. LPPs regulieren die Signaltransduktion von Zellen, indem sie extrazelluläre Phospholipide wie LPA dephosphorylieren und somit

inaktivieren [79, 84, 93]. Die meisten Zelltypen exprimieren mehrere LPA-Rezeptortypen und jeder Rezeptortyp kann intrazellulär verschiedene G-Proteine binden, sodass eine Reihe unterschiedlicher Signalkaskaden aktiviert werden kann, je nachdem welche LPA-Rezeptoren von der Zelle exprimiert werden [16, 70]. Es ist wahrscheinlich, dass Fibroblasten und postmitotische Neurone verschiedene LPA-Rezeptorkombinationen exprimieren und unterschiedliche Signalkaskaden aktivieren, was die unterschiedliche Reaktion von Fibroblasten und Neuronen auf einen LPP-Knockdown erklären könnte. Weitere Hinweise auf eine Rolle von LPPs in Zellmigrationsprozessen während der Entwicklung stammen aus *Drosophila*-Studien. Die LPP-homologen Wunen-Proteine Wun und Wun2 sind an der Kontrolle der Keimzellmigration in *Drosophila* entscheidend beteiligt, indem sie abstoßend auf migrierende Keimzellen wirken [80, 172-174].

Da es sich bei der radialen Kortextmigration um einen von vielen Einflussfaktoren abhängigen Prozess handelt, gibt es verschiedenste Hypothesen, wie LPP1 und -1a in diese Prozesse eingreifen könnten:

- Der LPP1/1a-Knockdown führt zu Veränderungen des Radialgliazetwerks bzw. zu einer veränderten Anheftung der migrierenden Neurone an die Radialgliazellen
- Der Knockdown von LPP1/1a verursacht Veränderungen des Zytoskeletts und damit der Zellmorphologie der Neurone
- Der LPP1/1a-Knockdown beeinflusst die Proliferation oder den Zellzyklus der neuronalen Vorläuferzellen
- Der Knockdown von LPP1/1a erschwert die radiale Kortextmigration der postmitotischen Neurone durch eine eingeschränkte Möglichkeit dieser Neurone zur Regulation des extrazellulären Phospholipidspiegels
- Der LPP1/1a-Knockdown führt zu einer Veränderung des intrazellulären Phospholipidspiegels und dadurch zu Veränderungen in der Signaltransduktion

Im Folgenden werden die einzelnen Hypothesen, von denen einige im Rahmen dieser Arbeit experimentell überprüft wurden, genauer erläutert und diskutiert.

Morphologie des Radialgliazetwerks und Anheftung der Neurone an die Radialglia

Während der radialen Kortextmigration migrieren postmitotische Neurone mit zunehmender Dicke der kortikalen Platte vermehrt durch Lokomotion entlang der Radialglia zu ihrem Bestimmungsort [7, 34]. Veränderungen des Radialgliazetwerks können die Ursache einer veränderten neuronalen Migration sein [54, 175]. Im Rahmen dieser Arbeit konnten aber

keine Unterschiede in der Dichte, Orientierung oder Morphologie der Radialglia nach Elektroporation mit LPP1/1a-shRNA *in utero* festgestellt werden (Abbildung 4.38).

Neben einer Veränderung der Radialglia selbst könnte die hier beobachtete Migrationsstörung auch durch eine Veränderung der Zell-Zell-Interaktion zwischen Radialglia und migrierenden Neuronen hervorgerufen werden. Für LPP3 ist bereits bekannt, dass es mittels einer Integrinbindestelle in der zweiten extrazellulären Schleife die Zell-Zell-Adhäsion von HEK293-Zellen regulieren kann [176, 177]. Das hierfür zuständige Arg-Gly-Asp- bzw. Arg-Gly-Glu-Motiv ist allerdings in LPP1 und -1a nicht konserviert. Außerdem waren die LPP1/1a-shRNA-transfizierten Neurone an E18,5 von ihrer Morphologie her nicht auffällig verändert (Abbildung 4.34), sondern entsprachen, soweit es in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zu erkennen war, in ihrer Morphologie derer kortikaler Neuronen während der Lokomotion entlang der Radialgliazellen [7, 21]. Der beobachteten Störung der radialen Kortexamigration liegt also wahrscheinlich keine Veränderung der Anheftung der Neurone an die Radialglia zugrunde.

Veränderungen der Zellmorphologie der Neurone

Die radiale Kortexamigration erfordert mehrere Schritte der Umordnung des Zytoskeletts und damit verbundenen Veränderungen der Zellmorphologie [36, 138]. Nach den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Knockdownexperimenten mittels LPP1- und -1a-shRNAs in N1E-115-Zellen lag die Vermutung nahe, dass LPP1 und -1a an der Regulation des Zytoskeletts beteiligt sind (Kapitel 4.2.2).

Obwohl Neurone, die an E13,5 mit LPP1/1a-shRNA elektroporiert werden, normalerweise zu Schicht II-III-Neuronen bestimmt sind, und diese sich morphologisch und funktionell deutlich von Schicht V-Neuronen unterscheiden [32], waren LPP1/1a-shRNA-Neurone interessanterweise in der Lage, die Morphologie eines Schicht V-Neurons anzunehmen. Die Anzahl dendritischer Endverzweigungen von LPP1/1a-shRNA-transfizierten Neuronen mit einem Migrationsstopp in der kortikalen Schicht V unterschied sich nicht von der Anzahl der Endverzweigungen von Schicht V-Kontrollneuronen (Abbildung 4.37). Da diese ein Maß für die Dendritenkomplexität sind, sind LPP1/1a-shRNA-Neurone also zur Umordnung des Zytoskeletts und dadurch zu Veränderungen ihrer Zellmorphologie in der Lage. Diese Neurone sind darüber hinaus sogar in der Lage, auszdifferenzieren und eine ihrer Umgebung entsprechende Zellmorphologie anzunehmen.

Im Rahmen einer Kooperation (Arne Battefeld und Dr. Ulf Strauss) konnte gezeigt werden, dass LPP1/1a-Knockdown-Neurone auch funktionell in der Lage waren, sich ihrer Umgebung

anzupassen. Elektrophysiologische Messungen ergaben, dass LPP1/1a-Knockdown-Neurone mit einer gestörten Migration in den unteren kortikalen Schichten an E18,5 im Vergleich zu Kontrollzellen aus der gleichen Region eine Veränderung des Verhältnisses der einwärts- zu den auswärts-gerichteten Ionenströmen aufwiesen. An P5 waren LPP1/1a-Knockdown-Neurone in der Schicht V elektrophysiologisch aber nicht mehr von Kontrollneuronen derselben Schicht zu unterscheiden. Das ist ein weiterer Hinweis darauf, dass LPP1/1a-shRNA-Neurone ein gestörtes Migrationsverhalten aufweisen, nach vorzeitiger Beendigung der Migration aber in der Lage sind, sich morphologisch und funktionell ihrer Umgebung anzupassen. Es ist also unwahrscheinlich, dass der beobachtete Migrationsstopp in den unteren kortikalen Schichten durch eine grundlegende Störung der Zytoskelettumordnung verursacht wird.

Proliferation und Zellzyklus der neuronalen Vorläuferzellen

Die Entwicklung des Kortex ist ein sehr komplexer Vorgang, der eine genaue Regulation der Proliferation und des Zellzyklus der neuronalen Vorläuferzellen erfordert. Störungen der radialen Migration können durch eine Störung der Proliferationsrate oder einen veränderten Austrittszeitpunkt aus dem Zellzyklus verursacht werden [138]. Es ist bekannt, dass LPA die Proliferation und den Zellzyklus neuronaler Vorläuferzellen beeinflussen kann [58, 71]. Zudem konnte gezeigt werden, dass dieser LPA-Effekt von einer Aktivierung der LPA₁- und/oder LPA₂-Rezeptoren abhängig ist [16, 58]. Da LPPs in der Lage sind, den extrazellulären LPA-Spiegel und damit die Aktivierung von LPA-Rezeptoren zu regulieren, könnten die Proliferation oder der Zellzyklus der neuronalen Vorläuferzellen ebenfalls durch einen LPP1/1a-Knockdown beeinflusst werden. Dies würde insbesondere den verspäteten Migrationsstart der LPP1/1a-shRNA-transfizierten Neurone aus der (sub)ventrikulären Zone in Richtung Intermediärzone und kortikale Platte erklären.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigten jedoch keine Veränderung der Proliferation neuronaler Vorläuferzellen nach LPP1/1a-Knockdown. Auch die Lokalisation und der Anteil neuronaler Vorläuferzellen in der Mitose-Phase waren im Vergleich zu den Kontrollzellen unverändert (Abbildung 4.42). Diese Ergebnisse stimmen mit Beobachtungen an Fibroblasten überein, in denen LPP2, nicht aber LPP1 und LPP3 an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt ist [141].

Lokal erhöhte extrazelluläre Phospholipidspiegel

LPA beeinflusst die kortikale Migration von Neuronen, wie Fukushima et al. anhand von morphologischen Veränderungen von Mausgehirnschnitten gezeigt haben [56]. Es wird vermutet, dass LPA während der Kortextwicklung von postmitotischen Neuronen in der kortikalen Platte sezerniert wird und mit den LPA-Rezeptoren der neuronalen Vorläuferzellen in der ventrikulären Zone interagiert (Abbildung 1.4). Hierfür spricht sowohl die starke LPA₁-Rezeptorexpression in der ventrikulären Zone des sich entwickelnden Kortex [178, 179] als auch die Expression des LPA-synthetisierenden Enzyms Autotaxin im embryonalen Gehirn [180]. Die Aktivierung des LPA₁-Rezeptors in neuronalen Vorläuferzellen führt zu einer Aktivierung der G-Protein-gekoppelten Signaltransduktion, was eine Retraktion der Zellausläufer, Zellrundung und die Wanderung des Zellkörpers zum Boden der ventrikulären Zone zur Folge haben kann [56].

Dieser Einfluss von LPA auf die Kortextwicklung legt nahe, dass auch LPP1 und -1a durch Regulation des extrazellulären LPA-Spiegels eine Rolle in diesen Prozessen spielen (Abbildung 5.1). Der in der vorliegenden Arbeit beobachtete verspätete Migrationsstart der Neurone mit LPP1/1a-Knockdown aus der (sub)ventrikulären Zone könnte auch darauf zurückzuführen sein, dass diese Neurone aufgrund des LPP1/1a-Knockdowns weniger LPA in ihrer direkten Umgebung degradieren können. Es wird vermutet, dass Neurone während der radialen Kortextmigration von unterschiedlichen diffusionsfähigen Faktoren an ihren Bestimmungsort geleitet werden. Diese Faktoren können dabei entweder anziehend oder abstoßend wirken [55]. Von postmitotischen Neuronen der kortikalen Platte gebildetes LPA scheint laut Befunden *in vitro* eher abstoßend zu wirkenden [56]. Normalerweise sind Neurone aber in der Lage, einen Teil des extrazellulären LPAs in ihrer direkten Mikroumgebung mittels LPP1/1a-Proteinen zu degradieren und dadurch die Aktivierung der LPA-Rezeptoren zu vermindern. Neurone mit LPP1/1a-Knockdown wären im Gegensatz dazu nur in verringertem Ausmaß zur Dephosphorylierung des LPAs in der Lage und könnten weniger schnell gegen einen LPA-Gradienten migrieren. Das würde erklären, warum Neurone mit einem LPP1/1a-Knockdown im Vergleich zu Neuronen mit normaler LPP1/1a-Expression verspätet mit der radialen Migration beginnen und als Folge dessen in der kortikalen Platte nicht mehr vollständig durch die unteren kortikalen Schichten zu ihrem Bestimmungsort migrieren können.

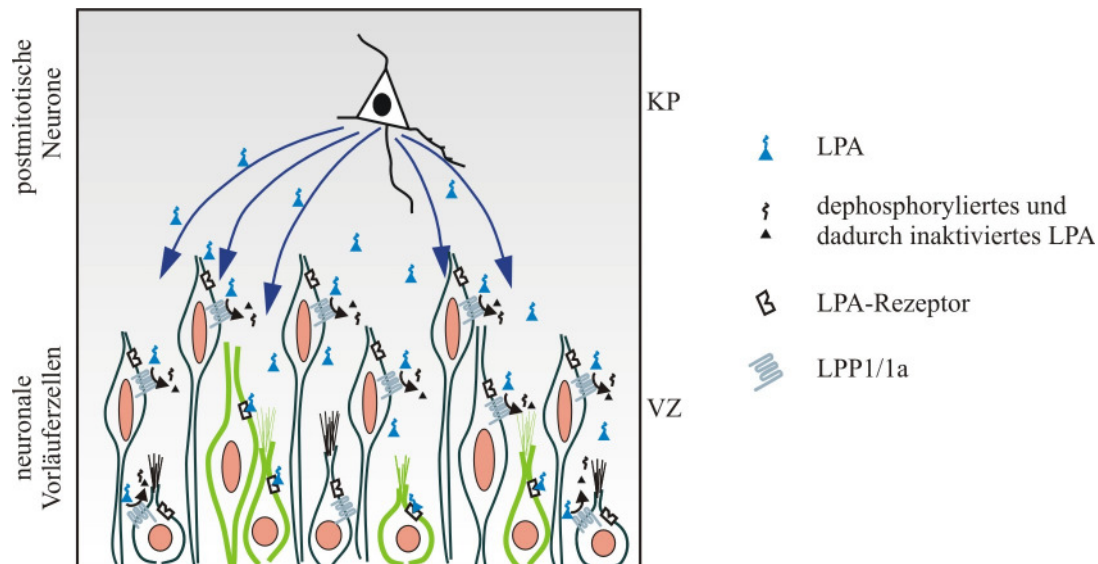


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der möglichen Funktion von LPP1/1a während der Kortexentwicklung. Postmitotische Neurone in der kortikalen Platte (KP) sezernieren extrazelluläres LPA, was an die LPA-Rezeptoren der Zellen in der ventrikulären Zone (VZ) bindet und dadurch inhibitorisch auf die Migration dieser Neurone wirkt. Neurone, die LPP1/1a exprimieren, können dieses extrazelluläre LPA in ihrer direkten Mikroumgebung dephosphorylieren und somit die LPA-Rezeptoraktivierung verhindern oder abschwächen. Neurone mit LPP1/1a-Knockdown (grün) sind nur in reduziertem Ausmaß zu einer LPA-Dephosphorylierung in der Lage, weshalb sie im Vergleich zu den Kontrollzellen eine verlangsamte radiale Migration aufweisen. Modifiziert nach [56].

Zur Untersuchung dieser Hypothese, wären aber noch weitere Experimente notwendig. Zum Nachweis, dass der hier beobachtete Migrationseffekt tatsächlich durch eine geringere Abbaurate von extrazellulärem LPA und einer dadurch verringerten LPA-Rezeptoraktivierung verursacht wird, könnten die LPP1/1a-Elektroporationsversuche *in utero* z.B. an LPA-Rezeptor-Knockoutmäusen wiederholt werden. Da der LPA_1 -Rezeptor während der embryonalen Entwicklung eine dominante Expression in der ventrikulären Zone aufweist, liegt die Vermutung nahe, dass er an dem LPP1/1a-Effekt bei der radialen Kortexmigration beteiligt ist. Deshalb wäre es naheliegend, LPA_1 -Rezeptor-Knockoutmäuse [181] *in utero* mit LPP1/1a-shRNA zu elektroporieren. Wenn der in dieser Arbeit beobachtete Effekt von LPP1/1a auf die radiale Kortexmigration durch die Dephosphorylierung von extrazellulärem LPA mittels LPP1/1a und die dadurch verringerte Aktivierung des LPA_1 -Rezeptors zu erklären wäre, müssten die Auswirkungen eines LPP1/1a-Knockdowns in LPA_1 -Rezeptor-Knockoutmausembryonen im Vergleich zu den hier eingesetzten Wildtypmausembryonen geringer ausfallen. Hierbei ist aber zu beachten, dass auch andere LPP-Substrate wie Sphingosin-1-phosphat (S1P) an der durch LPP1/1a-Knockdown verursachten Migrationsstörung beteiligt sein könnten, da auch der $S1P_1$ -Rezeptor eine starke spezifische Expression in der ventrikulären Zone von Mausembryonen aufweist [179].

Veränderte Signaltransduktion durch Modifikation des intrazellulären Phospholipidspiegels

LPPs befinden sich nicht nur in der Plasmamembran, sondern auch in intrazellulären Membranen [79, 84]. Es gibt Hinweise dafür, dass LPPs neben dem Abbau extrazellulärer Phospholipide auch einen Einfluss auf den intrazellulären Phospholipidspiegel haben und dadurch intrazelluläre Signalwege beeinflussen können [59, 82, 95]. Die eingeschränkte Kontrolle des intrazellulären Phospholipidspiegels in Zellen mit einem LPP1/1a-Knockdown und die dadurch unter Umständen modifizierten intrazellulären Signalkaskaden kommen ebenfalls als Ursache der hier beobachteten Migrationsstörungen in Betracht. Dabei ist jedoch noch völlig unklar, ob und wenn ja welche intrazellulären Signalwege durch Modifikation des LPP1/1a-Expressionsniveaus in Neuronen beeinflusst werden, da Studien aus anderen Zellsystemen nicht ohne weiteres auf kortikale Neuronen übertragen werden können. Studien an Neuronen aus LPP1/1a-Knockoutmäusen könnten hierüber Aufschluss geben. Bisher existiert aber nur ein LPP1-Knockout, der durch „Gene-trapping“ unter Einfügung einer Sequenz zum Transkriptionsabbruch zwischen Exon 1 und Exon 2 erzeugt wurde. In diesen Mäusen, die lebensfähig und vom Phänotyp her unauffällig sind, ist die LPP1-Expression im Gehirn aufgrund einer unbekannt Ursache unerwarteterweise im Vergleich zu Wildtypmäusen unverändert [98]. Deshalb eignet sich diese Mauslinie auch nicht für funktionelle Untersuchungen an Neuronen während der ZNS-Entwicklung.

Da es sich bei der Kortextentwicklung um einen sehr komplexen Prozess mit vielen bisher noch nicht bekannten Einflussgrößen handelt, konnten hier nur einige der naheliegendsten möglichen Ursachen für die veränderte Migration von Neuronen nach LPP1/1a-Knockdown diskutiert werden. Es ist aber nicht auszuschließen, dass den in dieser Arbeit beobachteten Veränderungen andere hier nicht berücksichtigte Ursachen oder eine Kombination der diskutierten Möglichkeiten zugrunde liegen. Es muss in diesem Zusammenhang vor allem beachtet werden, dass LPP1 und -1a keine ausschließliche Substratspezifität für LPA besitzen, sondern dass LPP1 und -1a neben LPA eine Reihe weiterer Phospholipide wie Sphingosin-1-phosphat (S1P), Ceramid-1-phosphat (C1P) oder Phosphatidat (PA) dephosphorylieren können. Da die Funktion dieser Phospholipide während der Kortextentwicklung bisher aber noch weitgehend unbekannt ist, wurde in erster Linie auf eine mögliche Beeinflussung des extrazellulären LPA-Spiegels eingegangen, was aber nicht bedeutet, dass die durch LPP1/1a-Knockdown verursachte Migrationsstörung nicht evtl. auch auf die Interaktion von LPP1/1a mit anderen Phospholipiden zurückzuführen ist.

5.3 Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse tragen dazu bei, die Funktionen von PRG3 sowie LPP1 und -1a während der Gehirnentwicklung und der neuronalen Differenzierung genauer einzugrenzen. Aufbauend auf diesen grundlegenden Erkenntnissen können Prozesse weitergehend untersucht werden, die an der Entstehung und der Funktion bzw. dem Umbau des ZNS beteiligt sind. Dies könnte zu neuen Erkenntnissen über die Entstehung und Funktion des ZNS führen sowie zur Aufklärung der Ursachen angeborener Fehlbildungen des Gehirns.

6 Literatur

1. Temburni, M.K. and M.H. Jacob, *New functions for glia in the brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(7): p. 3631-2.
2. Fields, R.D. and B. Stevens-Graham, *New insights into neuron-glia communication*. Science, 2002. **298**(5593): p. 556-62.
3. Rossi, D. and A. Volterra, *Astrocytic dysfunction: Insights on the role in neurodegeneration*. Brain Res Bull, 2009.
4. Aloisi, F., *Immune function of microglia*. Glia, 2001. **36**(2): p. 165-79.
5. Wiggin, G.R., J.P. Fawcett, and T. Pawson, *Polarity proteins in axon specification and synaptogenesis*. Dev Cell, 2005. **8**(6): p. 803-16.
6. Conde, C. and A. Caceres, *Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites*. Nat Rev Neurosci, 2009. **10**(5): p. 319-32.
7. Arimura, N. and K. Kaibuchi, *Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(3): p. 194-205.
8. Nimchinsky, E.A., B.L. Sabatini, and K. Svoboda, *Structure and function of dendritic spines*. Annu Rev Physiol, 2002. **64**: p. 313-53.
9. Mingorance-Le Meur, A. and T.P. O'Connor, *Neurite consolidation is an active process requiring constant repression of protrusive activity*. Embo J, 2009. **28**(3): p. 248-60.
10. Schwamborn, J.C., Y. Li, and A.W. Puschel, *GTPases and the control of neuronal polarity*. Methods Enzymol, 2006. **406**: p. 715-27.
11. Dent, E.W., et al., *Netrin-1 and semaphorin 3A promote or inhibit cortical axon branching, respectively, by reorganization of the cytoskeleton*. J Neurosci, 2004. **24**(12): p. 3002-12.
12. Dotti, C.G., C.A. Sullivan, and G.A. Banker, *The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture*. J Neurosci, 1988. **8**(4): p. 1454-68.
13. Bradke, F. and C.G. Dotti, *Establishment of neuronal polarity: lessons from cultured hippocampal neurons*. Curr Opin Neurobiol, 2000. **10**(5): p. 574-81.
14. Bradke, F. and C.G. Dotti, *The role of local actin instability in axon formation*. Science, 1999. **283**(5409): p. 1931-4.

15. Chilton, J.K., *Molecular mechanisms of axon guidance*. Dev Biol, 2006. **292**(1): p. 13-24.
16. Noguchi, K., et al., *Lysophosphatidic acid (LPA) and its receptors*. Curr Opin Pharmacol, 2009. **9**(1): p. 15-23.
17. Pebay, A., C.S. Bonder, and S.M. Pitson, *Stem cell regulation by lysophospholipids*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2007. **84**(3-4): p. 83-97.
18. Fukushima, N. and Y. Morita, *Actomyosin-dependent microtubule rearrangement in lysophosphatidic acid-induced neurite remodeling of young cortical neurons*. Brain Res, 2006. **1094**(1): p. 65-75.
19. Dent, E.W. and F.B. Gertler, *Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance*. Neuron, 2003. **40**(2): p. 209-27.
20. Bouquet, C. and F. Nothias, *Molecular mechanisms of axonal growth*. Adv Exp Med Biol, 2007. **621**: p. 1-16.
21. Barnes, A.P., D. Solecki, and F. Polleux, *New insights into the molecular mechanisms specifying neuronal polarity in vivo*. Curr Opin Neurobiol, 2008. **18**(1): p. 44-52.
22. Saba, J.D., *Lysophospholipids in development: Miles apart and edging in*. J Cell Biochem, 2004. **92**(5): p. 967-92.
23. Ayala, R., T. Shu, and L.H. Tsai, *Trekking across the brain: the journey of neuronal migration*. Cell, 2007. **128**(1): p. 29-43.
24. Marin, O. and J.L. Rubenstein, *Cell migration in the forebrain*. Annu Rev Neurosci, 2003. **26**: p. 441-83.
25. Gotz, M. and L. Sommer, *Cortical development: the art of generating cell diversity*. Development, 2005. **132**(15): p. 3327-32.
26. Nadarajah, B. and J.G. Parnavelas, *Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex*. Nat Rev Neurosci, 2002. **3**(6): p. 423-32.
27. Bishop, K.M., G. Goudreau, and D.D. O'Leary, *Regulation of area identity in the mammalian neocortex by Emx2 and Pax6*. Science, 2000. **288**(5464): p. 344-9.
28. Molyneaux, B.J., et al., *Neuronal subtype specification in the cerebral cortex*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(6): p. 427-37.
29. Rakic, P., et al., *Decision by division: making cortical maps*. Trends Neurosci, 2009. **32**(5): p. 291-301.

30. Noctor, S.C., et al., *Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases*. Nat Neurosci, 2004. **7**(2): p. 136-44.
31. Hevner, R.F., et al., *Beyond laminar fate: toward a molecular classification of cortical projection/pyramidal neurons*. Dev Neurosci, 2003. **25**(2-4): p. 139-51.
32. Hevner, R.F., *Layer-specific markers as probes for neuron type identity in human neocortex and malformations of cortical development*. J Neuropathol Exp Neurol, 2007. **66**(2): p. 101-9.
33. Gotz, M. and W.B. Huttner, *The cell biology of neurogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(10): p. 777-88.
34. Gupta, A., L.H. Tsai, and A. Wynshaw-Boris, *Life is a journey: a genetic look at neocortical development*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(5): p. 342-55.
35. Dehay, C. and H. Kennedy, *Cell-cycle control and cortical development*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(6): p. 438-50.
36. Kawauchi, T. and M. Hoshino, *Molecular pathways regulating cytoskeletal organization and morphological changes in migrating neurons*. Dev Neurosci, 2008. **30**(1-3): p. 36-46.
37. Ozmen, M., et al., *Clinical features of 21 patients with lissencephaly type I (agyria-pachygyria)*. Turk J Pediatr, 2000. **42**(3): p. 210-4.
38. Reiner, O., et al., *Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats*. Nature, 1993. **364**(6439): p. 717-21.
39. Lambert de Rouvroit, C. and A.M. Goffinet, *Neuronal migration*. Mech Dev, 2001. **105**(1-2): p. 47-56.
40. Hong, S.E., et al., *Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations*. Nat Genet, 2000. **26**(1): p. 93-6.
41. Fox, J.W., et al., *Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia*. Neuron, 1998. **21**(6): p. 1315-25.
42. Gressens, P., *Neuronal migration disorders*. J Child Neurol, 2005. **20**(12): p. 969-71.
43. Yoshida, A., et al., *Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1*. Dev Cell, 2001. **1**(5): p. 717-24.
44. Anton, E.S., J.A. Kreidberg, and P. Rakic, *Distinct functions of alpha3 and alpha(v) integrin receptors in neuronal migration and laminar organization of the cerebral cortex*. Neuron, 1999. **22**(2): p. 277-89.

45. Graus-Porta, D., et al., *Beta1-class integrins regulate the development of laminae and folia in the cerebral and cerebellar cortex*. *Neuron*, 2001. **31**(3): p. 367-79.
46. Adams, N.C., et al., *Mice that lack astrotactin have slowed neuronal migration*. *Development*, 2002. **129**(4): p. 965-72.
47. Cahana, A., et al., *Targeted mutagenesis of Lis1 disrupts cortical development and LIS1 homodimerization*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(11): p. 6429-34.
48. Bai, J., et al., *RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex*. *Nat Neurosci*, 2003. **6**(12): p. 1277-83.
49. Manent, J.B., et al., *Dcx reexpression reduces subcortical band heterotopia and seizure threshold in an animal model of neuronal migration disorder*. *Nat Med*, 2009. **15**(1): p. 84-90.
50. Ohshima, T., et al., *Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(20): p. 11173-8.
51. Gilmore, E.C., et al., *Cyclin-dependent kinase 5-deficient mice demonstrate novel developmental arrest in cerebral cortex*. *J Neurosci*, 1998. **18**(16): p. 6370-7.
52. Sobeih, M.M. and G. Corfas, *Extracellular factors that regulate neuronal migration in the central nervous system*. *Int J Dev Neurosci*, 2002. **20**(3-5): p. 349-57.
53. Rice, D.S. and T. Curran, *Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development*. *Annu Rev Neurosci*, 2001. **24**: p. 1005-39.
54. Halfter, W., et al., *A critical function of the pial basement membrane in cortical histogenesis*. *J Neurosci*, 2002. **22**(14): p. 6029-40.
55. Zheng, W. and X. Yuan, *Guidance of cortical radial migration by gradient of diffusible factors*. *Cell Adh Migr*, 2008. **2**(1): p. 48-50.
56. Fukushima, N., J.A. Weiner, and J. Chun, *Lysophosphatidic acid (LPA) is a novel extracellular regulator of cortical neuroblast morphology*. *Dev Biol*, 2000. **228**(1): p. 6-18.
57. Fukushima, N., et al., *Lysophosphatidic acid influences the morphology and motility of young, postmitotic cortical neurons*. *Mol Cell Neurosci*, 2002. **20**(2): p. 271-82.
58. Kingsbury, M.A., et al., *Non-proliferative effects of lysophosphatidic acid enhance cortical growth and folding*. *Nat Neurosci*, 2003. **6**(12): p. 1292-9.

59. Pilquill, C., et al., *Lipid phosphate phosphatase-1 regulates lysophosphatidate-induced fibroblast migration by controlling phospholipase D2-dependent phosphatidate generation*. J Biol Chem, 2006. **281**(50): p. 38418-29.
60. Balazs, L., et al., *Topical application of the phospholipid growth factor lysophosphatidic acid promotes wound healing in vivo*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2001. **280**(2): p. R466-72.
61. Yoshida, K., et al., *Vascular remodeling induced by naturally occurring unsaturated lysophosphatidic acid in vivo*. Circulation, 2003. **108**(14): p. 1746-52.
62. Cheng, Y., et al., *Lysophosphatidic acid-induced arterial wall remodeling: Requirement of PPARgamma but not LPA(1) or LPA(2) GPCR*. Cell Signal, 2009.
63. Mills, G.B. and W.H. Moolenaar, *The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(8): p. 582-91.
64. Brauer, A.U. and R. Nitsch, *Plasticity-related genes (PRGs/LRPs): a brain-specific class of lysophospholipid-modifying proteins*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1781**(9): p. 595-600.
65. Tokumura, A., *Metabolic pathways and physiological and pathological significances of lysolipid phosphate mediators*. J Cell Biochem, 2004. **92**(5): p. 869-81.
66. Tabata, K., et al., *The orphan GPCR GPR87 was deorphanized and shown to be a lysophosphatidic acid receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **363**(3): p. 861-6.
67. Pasternack, S.M., et al., *G protein-coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth*. Nat Genet, 2008. **40**(3): p. 329-34.
68. Murakami, M., et al., *Identification of the orphan GPCR, P2Y(10) receptor as the sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **371**(4): p. 707-12.
69. Ishii, I., et al., *Lysophospholipid receptors: signaling and biology*. Annu Rev Biochem, 2004. **73**: p. 321-54.
70. Ishii, S., K. Noguchi, and K. Yanagida, *Non-Edg family lysophosphatidic acid (LPA) receptors*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2009. **89**(3-4): p. 57-65.
71. Fukushima, N., Y. Kimura, and J. Chun, *A single receptor encoded by vzg-1/lpA1/edg-2 couples to G proteins and mediates multiple cellular responses to lysophosphatidic acid*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): p. 6151-6.

72. Weiner, J.A. and J. Chun, *Schwann cell survival mediated by the signaling phospholipid lysophosphatidic acid*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(9): p. 5233-8.
73. Ishii, I., et al., *Functional comparisons of the lysophosphatidic acid receptors, LP(A1)/VZG-1/EDG-2, LP(A2)/EDG-4, and LP(A3)/EDG-7 in neuronal cell lines using a retrovirus expression system*. Mol Pharmacol, 2000. **58**(5): p. 895-902.
74. Jalink, K., et al., *Lysophosphatidic acid induces neuronal shape changes via a novel, receptor-mediated signaling pathway: similarity to thrombin action*. Cell Growth Differ, 1993. **4**(4): p. 247-55.
75. Nurnberg, A., et al., *Antagonistic regulation of neurite morphology through Gq/G11 and G12/G13*. J Biol Chem, 2008. **283**(51): p. 35526-31.
76. Fukushima, N., et al., *Dual regulation of actin rearrangement through lysophosphatidic acid receptor in neuroblast cell lines: actin depolymerization by Ca(2+)-alpha-actinin and polymerization by rho*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(8): p. 2692-705.
77. Rakic, P., *A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution*. Trends Neurosci, 1995. **18**(9): p. 383-8.
78. Aoki, J., *Mechanisms of lysophosphatidic acid production*. Semin Cell Dev Biol, 2004. **15**(5): p. 477-89.
79. Brindley, D.N., *Lipid phosphate phosphatases and related proteins: signaling functions in development, cell division, and cancer*. J Cell Biochem, 2004. **92**(5): p. 900-12.
80. Sigal, Y.J., M.I. McDermott, and A.J. Morris, *Integral membrane lipid phosphatases/phosphotransferases: common structure and diverse functions*. Biochem J, 2005. **387**(Pt 2): p. 281-93.
81. Dircks, L. and H.S. Sul, *Acyltransferases of de novo glycerophospholipid biosynthesis*. Prog Lipid Res, 1999. **38**(5-6): p. 461-79.
82. Brindley, D.N., et al., *Phosphatidate degradation: Phosphatidate phosphatases (lipins) and lipid phosphate phosphatases*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1791**(9): p. 956-61.
83. Brindley, D.N. and D.W. Waggoner, *Mammalian lipid phosphate phosphohydrolases*. J Biol Chem, 1998. **273**(38): p. 24281-4.
84. Brindley, D.N. and C. Pilquill, *Lipid phosphate phosphatases and signaling*. J Lipid Res, 2009. **50 Suppl**: p. S225-30.

85. Zhang, Q.X., et al., *Identification of structurally important domains of lipid phosphate phosphatase-1: implications for its sites of action*. *Biochem J*, 2000. **345 Pt 2**: p. 181-4.
86. Long, J.S., N.J. Pyne, and S. Pyne, *Lipid phosphate phosphatases form homo- and hetero-oligomers: catalytic competency, subcellular distribution and function*. *Biochem J*, 2008. **411(2)**: p. 371-7.
87. Nanjundan, M. and F. Possmayer, *Molecular cloning and expression of pulmonary lipid phosphate phosphohydrolases*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001. **281(6)**: p. L1484-93.
88. Yamanaka, M., et al., *A splicing isoform of LPP1, LPP1a, exhibits high phosphatase activity toward FTY720 phosphate*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **375(4)**: p. 675-9.
89. Kai, M., et al., *Lipid phosphate phosphatases 1 and 3 are localized in distinct lipid rafts*. *J Biochem*, 2006. **140(5)**: p. 677-86.
90. Kai, M., et al., *Cloning and characterization of two human isozymes of Mg²⁺-independent phosphatidic acid phosphatase*. *J Biol Chem*, 1997. **272(39)**: p. 24572-8.
91. Sciorra, V.A. and A.J. Morris, *Sequential actions of phospholipase D and phosphatidic acid phosphohydrolase 2b generate diglyceride in mammalian cells*. *Mol Biol Cell*, 1999. **10(11)**: p. 3863-76.
92. Hooks, S.B., S.P. Ragan, and K.R. Lynch, *Identification of a novel human phosphatidic acid phosphatase type 2 isoform*. *FEBS Lett*, 1998. **427(2)**: p. 188-92.
93. Pyne, S., K.C. Kong, and P.I. Darroch, *Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate biology: the role of lipid phosphate phosphatases*. *Semin Cell Dev Biol*, 2004. **15(5)**: p. 491-501.
94. Moolenaar, W.H., L.A. van Meeteren, and B.N. Giepmans, *The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling*. *Bioessays*, 2004. **26(8)**: p. 870-81.
95. Pyne, S., et al., *Lipid phosphate phosphatases and lipid phosphate signalling*. *Biochem Soc Trans*, 2005. **33(Pt 6)**: p. 1370-4.
96. Zhang, N., J.P. Sundberg, and T. Gridley, *Mice mutant for Ppap2c, a homolog of the germ cell migration regulator wunen, are viable and fertile*. *Genesis*, 2000. **27(4)**: p. 137-40.
97. Escalante-Alcalde, D., et al., *The lipid phosphatase LPP3 regulates extra-embryonic vasculogenesis and axis patterning*. *Development*, 2003. **130(19)**: p. 4623-37.

98. Tomsig, J.L., et al., *Lipid phosphate phosphohydrolase type 1 (LPP1) degrades extracellular lysophosphatidic acid in vivo*. *Biochem J*, 2009. **419**(3): p. 611-8.
99. Yue, J., et al., *Mice with transgenic overexpression of lipid phosphate phosphatase-1 display multiple organotypic deficits without alteration in circulating lysophosphatidate level*. *Cell Signal*, 2004. **16**(3): p. 385-99.
100. Savaskan, N.E. and R. Nitsch, *Molecules involved in reactive sprouting in the hippocampus*. *Rev Neurosci*, 2001. **12**(3): p. 195-215.
101. Skutella, T. and R. Nitsch, *New molecules for hippocampal development*. *Trends Neurosci*, 2001. **24**(2): p. 107-13.
102. Brauer, A.U., et al., *A new phospholipid phosphatase, PRG-1, is involved in axon growth and regenerative sprouting*. *Nat Neurosci*, 2003. **6**(6): p. 572-8.
103. Savaskan, N.E., A.U. Brauer, and R. Nitsch, *Molecular cloning and expression regulation of PRG-3, a new member of the plasticity-related gene family*. *Eur J Neurosci*, 2004. **19**(1): p. 212-20.
104. McDermott, M.I., et al., *Is PRG-1 a new lipid phosphatase?* *Nat Neurosci*, 2004. **7**(8): p. 789; author reply 789-90.
105. Trimbuch, T., et al., *Synaptic PRG-1 modulates excitatory transmission via lipid phosphate-mediated signaling*. *Cell*, 2009. **138**(6): p. 1222-35.
106. Wang, W.Z. and Z. Molnar, *Dynamic pattern of mRNA expression of plasticity-related gene-3 (PRG-3) in the mouse cerebral cortex during development*. *Brain Res Bull*, 2005. **66**(4-6): p. 454-60.
107. Sigal, Y.J., et al., *Cdc42 and ARP2/3-independent regulation of filopodia by an integral membrane lipid-phosphatase-related protein*. *J Cell Sci*, 2007. **120**(Pt 2): p. 340-52.
108. Chen, J.G., et al., *Zfp312 is required for subcortical axonal projections and dendritic morphology of deep-layer pyramidal neurons of the cerebral cortex*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(49): p. 17792-7.
109. Birnboim, H.C. and J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. *Nucleic Acids Res*, 1979. **7**(6): p. 1513-23.
110. Feng, L., et al., *Cullin 5 regulates Dab1 protein levels and neuron positioning during cortical development*. *Genes Dev*, 2007. **21**(21): p. 2717-30.
111. Kai, M., et al., *Identification and cDNA cloning of 35-kDa phosphatidic acid phosphatase (type 2) bound to plasma membranes*. *Polymerase chain reaction*

- amplification of mouse H2O2-inducible hic53 clone yielded the cDNA encoding phosphatidic acid phosphatase. J Biol Chem, 1996. 271(31): p. 18931-8.*
112. Barila, D., et al., *The Dri 42 gene, whose expression is up-regulated during epithelial differentiation, encodes a novel endoplasmic reticulum resident transmembrane protein. J Biol Chem, 1996. 271(47): p. 29928-36.*
113. Elder, J.H. and S. Alexander, *endo-beta-N-acetylglucosaminidase F: endoglycosidase from Flavobacterium meningosepticum that cleaves both high-mannose and complex glycoproteins. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. 79(15): p. 4540-4.*
114. Alexander, S. and J.H. Elder, *Endoglycosidases from Flavobacterium meningosepticum application to biological problems. Methods Enzymol, 1989. 179: p. 505-18.*
115. Cheung, J.C. and R.A. Reithmeier, *Scanning N-glycosylation mutagenesis of membrane proteins. Methods, 2007. 41(4): p. 451-9.*
116. Leuenberger, B., et al., *Human meprin beta: O-linked glycans in the intervening region of the type I membrane protein protect the C-terminal region from proteolytic cleavage and diminish its secretion. Biochem J, 2003. 369(Pt 3): p. 659-65.*
117. Doetschman, T.C., et al., *The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. J Embryol Exp Morphol, 1985. 87: p. 27-45.*
118. Williams, R.L., et al., *Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. Nature, 1988. 336(6200): p. 684-7.*
119. Seiler, A., et al., *Current status of the embryonic stem cell test: the use of recent advances in the field of stem cell technology and gene expression analysis. Altex, 2006. 23 Suppl: p. 393-9.*
120. Ying, Q.L., et al., *Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. Nat Biotechnol, 2003. 21(2): p. 183-6.*
121. Seiler, A., et al., *Improvement of an in vitro stem cell assay for developmental toxicity: the use of molecular endpoints in the embryonic stem cell test. Reprod Toxicol, 2004. 18(2): p. 231-40.*
122. Smyth, S.S., et al., *Lipid phosphate phosphatases regulate lysophosphatidic acid production and signaling in platelets: studies using chemical inhibitors of lipid phosphate phosphatase activity. J Biol Chem, 2003. 278(44): p. 43214-23.*
123. Shastri, P., A. Basu, and M.S. Rajadhyaksha, *Neuroblastoma cell lines--a versatile in vitro model in neurobiology. Int J Neurosci, 2001. 108(1-2): p. 109-26.*

124. Marler, K.J., et al., *Outgrowth of neurites from NIE-115 neuroblastoma cells is prevented on repulsive substrates through the action of PAK*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(12): p. 5226-41.
125. Grimby, C., et al., *Growth Hormone Production and Action in NIE-115 Neuroblastoma Cells*. J Mol Neurosci, 2009.
126. Jalink, K. and W.H. Moolenaar, *Thrombin receptor activation causes rapid neural cell rounding and neurite retraction independent of classic second messengers*. J Cell Biol, 1992. **118**(2): p. 411-9.
127. Amano, T., E. Richelson, and M. Nirenberg, *Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones (neuroblast differentiation-cell culture-choline acetyltransferase-acetylcholinesterase-tyrosine hydroxylase-axons-dendrites)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1972. **69**(1): p. 258-63.
128. Tuschl, T., et al., *Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro*. Genes Dev, 1999. **13**(24): p. 3191-7.
129. Caplen, N.J., et al., *Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(17): p. 9742-7.
130. Elbashir, S.M., et al., *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. Nature, 2001. **411**(6836): p. 494-8.
131. Brummelkamp, T.R., R. Bernards, and R. Agami, *A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells*. Science, 2002. **296**(5567): p. 550-3.
132. Williams, B.J., et al., *The prototype gamma-2 herpesvirus nucleocytoplasmic shuttling protein, ORF 57, transports viral RNA through the cellular mRNA export pathway*. Biochem J, 2005. **387**(Pt 2): p. 295-308.
133. Saito, T. and N. Nakatsuji, *Efficient gene transfer into the embryonic mouse brain using in vivo electroporation*. Dev Biol, 2001. **240**(1): p. 237-46.
134. Tabata, H. and K. Nakajima, *Efficient in utero gene transfer system to the developing mouse brain using electroporation: visualization of neuronal migration in the developing cortex*. Neuroscience, 2001. **103**(4): p. 865-72.
135. Shimogori, T. and M. Ogawa, *Gene application with in utero electroporation in mouse embryonic brain*. Dev Growth Differ, 2008. **50**(6): p. 499-506.
136. Tabata, H. and K. Nakajima, *Labeling embryonic mouse central nervous system cells by in utero electroporation*. Dev Growth Differ, 2008. **50**(6): p. 507-11.

137. Kawauchi, T., et al., *The in vivo roles of STEF/Tiam1, Rac1 and JNK in cortical neuronal migration*. *Embo J*, 2003. **22**(16): p. 4190-201.
138. de Nijs, L., et al., *EFHC1 interacts with microtubules to regulate cell division and cortical development*. *Nat Neurosci*, 2009. **12**(10): p. 1266-74.
139. Chen, G., et al., *Semaphorin-3A guides radial migration of cortical neurons during development*. *Nat Neurosci*, 2008. **11**(1): p. 36-44.
140. Yu, X. and R.C. Malenka, *Beta-catenin is critical for dendritic morphogenesis*. *Nat Neurosci*, 2003. **6**(11): p. 1169-77.
141. Morris, K.E., L.M. Schang, and D.N. Brindley, *Lipid phosphate phosphatase-2 activity regulates S-phase entry of the cell cycle in Rat2 fibroblasts*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(14): p. 9297-306.
142. Gratzner, H.G., et al., *The use of antibody specific for bromodeoxyuridine for the immunofluorescent determination of DNA replication in single cells and chromosomes*. *Exp Cell Res*, 1975. **95**(1): p. 88-94.
143. Apweiler, R., H. Hermjakob, and N. Sharon, *On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database*. *Biochim Biophys Acta*, 1999. **1473**(1): p. 4-8.
144. Witte, H. and F. Bradke, *The role of the cytoskeleton during neuronal polarization*. *Curr Opin Neurobiol*, 2008. **18**(5): p. 479-87.
145. Griffin, T.J., et al., *Complementary profiling of gene expression at the transcriptome and proteome levels in *Saccharomyces cerevisiae**. *Mol Cell Proteomics*, 2002. **1**(4): p. 323-33.
146. Lee, P.S., et al., *Insights into the relation between mrna and protein expression patterns: II. Experimental observations in *Escherichia coli**. *Biotechnol Bioeng*, 2003. **84**(7): p. 834-41.
147. Hack, C.J., *Integrated transcriptome and proteome data: the challenges ahead*. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2004. **3**(3): p. 212-9.
148. Cox, B., T. Kislinger, and A. Emili, *Integrating gene and protein expression data: pattern analysis and profile mining*. *Methods*, 2005. **35**(3): p. 303-14.
149. Khodursky, A.B. and J.A. Bernstein, *Life after transcription--revisiting the fate of messenger RNA*. *Trends Genet*, 2003. **19**(3): p. 113-5.
150. Fu, N., et al., *Comparison of protein and mRNA expression evolution in humans and chimpanzees*. *PLoS One*, 2007. **2**(2): p. e216.

151. Tate, C.G., *Overexpression of mammalian integral membrane proteins for structural studies*. FEBS Lett, 2001. **504**(3): p. 94-8.
152. Wagner, S., et al., *Rationalizing membrane protein overexpression*. Trends Biotechnol, 2006. **24**(8): p. 364-71.
153. Luo, L., *Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2002. **18**: p. 601-35.
154. Fais, S., et al., *Linkage between cell membrane proteins and actin-based cytoskeleton: the cytoskeletal-driven cellular functions*. Histol Histopathol, 2000. **15**(2): p. 539-49.
155. Ridley, A.J., et al., *Cell migration: integrating signals from front to back*. Science, 2003. **302**(5651): p. 1704-9.
156. Gartner, A. and C.G. Dotti, *Neuronal polarity: consolidation for growth, growth for consolidation*. Embo J, 2009. **28**(3): p. 173-4.
157. Eickholt, B.J., F.S. Walsh, and P. Doherty, *An inactive pool of GSK-3 at the leading edge of growth cones is implicated in Semaphorin 3A signaling*. J Cell Biol, 2002. **157**(2): p. 211-7.
158. Jiang, H., et al., *Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: critical roles of GSK-3beta and its upstream regulators*. Cell, 2005. **120**(1): p. 123-35.
159. Dent, E.W. and K. Kalil, *Axon branching requires interactions between dynamic microtubules and actin filaments*. J Neurosci, 2001. **21**(24): p. 9757-69.
160. Zhou, F.Q. and W.D. Snider, *Intracellular control of developmental and regenerative axon growth*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2006. **361**(1473): p. 1575-92.
161. Todd, A.E., C.A. Orengo, and J.M. Thornton, *Sequence and structural differences between enzyme and nonenzyme homologs*. Structure, 2002. **10**(10): p. 1435-51.
162. Kim, S.A., et al., *Regulation of myotubularin-related (MTMR)2 phosphatidylinositol phosphatase by MTMR5, a catalytically inactive phosphatase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(8): p. 4492-7.
163. Inagaki, N., et al., *CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons*. Nat Neurosci, 2001. **4**(8): p. 781-2.
164. Shi, S.H., et al., *APC and GSK-3beta are involved in mPar3 targeting to the nascent axon and establishment of neuronal polarity*. Curr Biol, 2004. **14**(22): p. 2025-32.

165. Shi, S.H., L.Y. Jan, and Y.N. Jan, *Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity*. Cell, 2003. **112**(1): p. 63-75.
166. Schwamborn, J.C. and A.W. Puschel, *The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity*. Nat Neurosci, 2004. **7**(9): p. 923-9.
167. Jiang, H. and Y. Rao, *Axon formation: fate versus growth*. Nat Neurosci, 2005. **8**(5): p. 544-6.
168. Arimura, N. and K. Kaibuchi, *Key regulators in neuronal polarity*. Neuron, 2005. **48**(6): p. 881-4.
169. Escalante-Alcalde, D., S.L. Morales, and C.L. Stewart, *Generation of a reporter-null allele of Ppap2b/Lpp3 and its expression during embryogenesis*. Int J Dev Biol, 2009. **53**(1): p. 139-47.
170. Postma, F.R., et al., *Sphingosine-1-phosphate rapidly induces Rho-dependent neurite retraction: action through a specific cell surface receptor*. Embo J, 1996. **15**(10): p. 2388-92.
171. Kranenburg, O., et al., *Activation of RhoA by lysophosphatidic acid and Galpha12/13 subunits in neuronal cells: induction of neurite retraction*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(6): p. 1851-7.
172. Zhang, N., et al., *Identification and genetic analysis of wunen, a gene guiding Drosophila melanogaster germ cell migration*. Genetics, 1996. **143**(3): p. 1231-41.
173. Zhang, N., et al., *The Drosophila protein Wunen repels migrating germ cells*. Nature, 1997. **385**(6611): p. 64-7.
174. Starz-Gaiano, M., et al., *Spatially restricted activity of a Drosophila lipid phosphatase guides migrating germ cells*. Development, 2001. **128**(6): p. 983-91.
175. Hartfuss, E., et al., *Reelin signaling directly affects radial glia morphology and biochemical maturation*. Development, 2003. **130**(19): p. 4597-609.
176. Humtsoe, J.O., et al., *Murine lipid phosphate phosphohydrolase-3 acts as a cell-associated integrin ligand*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **335**(3): p. 906-19.
177. Humtsoe, J.O., et al., *Regulation of cell-cell interactions by phosphatidic acid phosphatase 2b/VCIP*. Embo J, 2003. **22**(7): p. 1539-54.
178. Hecht, J.H., et al., *Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex*. J Cell Biol, 1996. **135**(4): p. 1071-83.

-
179. McGiffert, C., et al., *Embryonic brain expression analysis of lysophospholipid receptor genes suggests roles for s1p(1) in neurogenesis and s1p(1-3) in angiogenesis.* FEBS Lett, 2002. **531**(1): p. 103-8.

 180. Savaskan, N.E., et al., *Autotaxin (NPP-2) in the brain: cell type-specific expression and regulation during development and after neurotrauma.* Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(2): p. 230-43.

 181. Contos, J.J., et al., *Requirement for the lpA1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(24): p. 13384-9.

7 Publikationen und Präsentationen

Publikationen

Velmans T.*, Baumgart J.*, Battefeld A., Savaskan N.E., Moolenaar W.H., Brindley D.N., Strauss U. and Bräuer A.U., Cortical layer organization is dependent on lipid phosphate phosphatases 1 and -1a. Dezember 2009 eingereicht bei PLoS Biology.

Battefeld A., Bierwirth C., Li Y., Barthel L., **Velmans T.**, Strauss U., I_h “run-up” in rat neocortical neurons and transiently rat HCN1-expressing HEK293 cells. November 2009 eingereicht bei Journal of Neurophysiology.

Velmans T., Battefeld A., Strauss U., Bräuer A.U., Plasticity Related Gene 3 might be involved in neuronal differentiation. Manuskript in Vorbereitung.

Coiro P., **Velmans T.**, and Bräuer A.U. Overexpression of Plasticity Related Gene 5 (PRG5), induces spine formation in immature primary neurons. Manuskript in Vorbereitung.

Stadler K.*, Bierwirth C.*, Schuchmann S., Battefeld A., Mix E., Bräuer A.U., **Velmans T.**, Nitsch R., Kole M.H.P. and Strauss U., Interferon- β regulates neocortical activity via h-channel modulation. Manuskript in Vorbereitung.

* gleichberechtigt

Präsentationen

Velmans T., Savaskan N.E., Moolenaar W.H., Nitsch R. and Bräuer A.U. (2006)
Berlin Neuroscience Forum, Liebenwalde (Deutschland)

Posterpräsentation

Lipid phosphate phosphatases promote neurite outgrowth.

Velmans T., Savaskan N.E., Moolenaar W.H., Nitsch R. and Bräuer A.U. (2006)
18th European Students´ Conference, Berlin (Deutschland)

Posterpräsentation

Lipid phosphate phosphatases induce neurite outgrowth.

Velmans T., Savaskan N.E., Pilquil C., Brindley D.N., Moolenaar W., Nitsch R. and Bräuer A.U. (2007)

FASEB Summer Research Conference, Tucson (Arizona, USA)

Posterpräsentation

Lipid phosphate phosphatases promote neuronal outgrowth.

Velmans T., Savaskan N.E., Moolenaar W.H., Nitsch R. and Bräuer A.U. (2007)
19th European Students´ Conference, Berlin (Deutschland)

Vortrag

Plasticity related gene-3: a new brain specific protein involved in brain development?

Velmans T., Savaskan N.E., Pilquil C., Brindley D.N., Moolenaar W., Nitsch R. and Bräuer A.U. (2007)
SFB 665, International Symposium: Developmental Disturbances in the Nervous System, Potsdam (Deutschland)

Posterpräsentation

Lipid phosphate phosphatases promote neuronal outgrowth.

Velmans T., Gutsch R., Baumgart J., Nitsch R and Bräuer A.U. (2008)
Berlin Neuroscience Forum, Liebenwalde (Deutschland)

Posterpräsentation

The involvement of lipid phosphate phosphatases in corticogenesis.

Velmans T., Baumgart J., Nitsch R and Bräuer A.U. (2008)
Berlin Brain Days 5th International Ph.D. Symposium, Berlin (Deutschland)

Vortrag

The role of lipid phosphate phosphatases in cortical layering.

Velmans T., Battefeld A., Baumgart J., Savaskan N.E., Brindley D.N., Moolenaar W.H., Nitsch R., Strauss U. and Bräuer A.U. (2009)
8th Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen (Deutschland)

Posterpräsentation

Lipid phosphate phosphatases control cortical layering during embryonic development.

8 Lebenslauf

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

9 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Tanja Velmans, geboren am 30.05.1977, an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt habe.

Berlin, den.....2009

.....

Tanja Velmans