

**Einfluss von Lysophosphatidsäure auf synaptische Transmission
und Expressionsanalysen von Plasticity related gene 1 und
LPA-Rezeptoren 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

Olga Kieselmann
aus Oxtjabrskij/Russland

Berlin
März 2010

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Juli 2006 bis März 2010 im Institut für Zell- und Neurobiologie, Centrum für Anatomie, Charité – Universitätsmedizin Berlin und unter der Leitung von Juniorprof. Dr. Anja U. Bräuer angefertigt.

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

Disputation am: 30.04.2010

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>II</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>V</i>
<i>Zusammenfassung</i>	<i>VII</i>
<i>Summary</i>	<i>IX</i>
1 Einleitung	1
1.1 Lysophosphatidsäure im zentralen Nervensystem	1
1.2 Biosynthese und Metabolismus von LPA	2
1.3 LPA-Rezeptoren und ihre Signaltransduktion	4
1.4 PRG1 moduliert LPA-Signaltransduktionsmechanismen	6
1.5 Grundlagen der synaptischen Transmission	9
1.6 Ca²⁺-abhängige Neurotransmission	12
1.7 Lipidregulation der Vesikelexozytose und –Endozytose	13
2 Ziel der Arbeit	15
3 Materialien und Methoden	17
3.1 Verwendete Materialien und Reagenzien	17
3.2 Geräte	17
3.3 Oligonukleotide	18
3.4 Konstrukte	18
3.5 Antikörper	18
3.6 Real-Time-PCR-Assays	19
3.7 Bakterienstämme und Zelllinien	20
3.8 Versuchstiere	20
3.9 Verwendete Puffer und Medien	20
3.9.1 Zell-Wachstumsmedium	20
3.9.2 Agarosegel-Elektrophorese	21
3.9.3 Plasmidextraktion	21
3.9.4 Proteinisolierung	22
3.9.5 Immunblot-Lösungen	22
3.9.6 Sonstige Puffer und Lösungen	22
3.10 Allgemeine molekularbiologische Methoden	23
3.10.1 Herstellung hitzekompetenter Zellen	23
3.10.2 Hitzetransformation in E. coli-Zellen	23
3.10.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	23
3.10.4 Minipräparation von Plasmid-DNA nach Birnboim/Doly	24

3.10.5	Maxipräparation von Plasmid-DNA	24
3.10.6	Isolierung von genomischer DNA und Genotypisierung	24
3.10.7	Restriktionsverdau	25
3.10.8	Agarosegel-Elektrophorese	25
3.10.9	DNA-Sequenzierung	25
3.11	Zellkultur	25
3.11.1	Auftauen und Einfrieren von Zellen	25
3.11.2	Kultur und Passage	26
3.11.3	Beschichtung mit Poly-L-Lysin	26
3.11.4	Primäre hippocampale Zellkultur	26
3.11.5	Transfektion	27
3.11.6	Behandlung mit LPA	28
3.12	Immunologische Färbungen	28
3.12.1	Immuncytochemie	28
3.12.2	Perfusion von Mäusen	28
3.12.3	Vibratonschnitte	29
3.12.4	Immunhistochemische Färbungen und DAB-Entwicklung	29
3.13	Mikroskopische Aufnahmen von fixierten Präparaten	30
3.13.1	Konfokalmikroskopische Untersuchung	30
3.13.2	Epon-Einbettung von Vibratonschnitten für Elektronenmikroskopie	30
3.14	Proteinbiochemische Methoden	31
3.14.1	Affinitätsaufreinigung des PRG1-Antikörpers	31
3.14.2	Isolierung von Fusionsproteinen	31
3.14.3	Proteinisolierung aus Mausgewebe	32
3.14.4	Affinitätsaufreinigung der Fusionsproteine über μ Macs-Säulen	32
3.14.5	Präparation der Synaptosomenfraktionen	32
3.14.6	Quantifizierung von Proteinkonzentrationen	33
3.15	Immunblot	33
3.15.1	SDS-PAGE	33
3.15.2	Western Blot	33
3.15.3	Immundetektion der transferierten Proteine	34
3.16	Quantitative Expressionsanalysen	34
3.16.1	Isolierung von total-RNA aus Zellen und Gewebe	34
3.16.2	Synthese der cDNA	35
3.16.3	Quantitative Real-Time-PCR	35
3.17	Fura-2-Messung	37
3.18	SynaptopHluorin-Messungen	38
3.19	FuraRed Ca²⁺-Messung	39
4	Ergebnisse	41
4.1	Expressionsstudien von PRG1	41
4.1.1	Polyklonaler Peptidantikörper gegen PRG1	41
4.1.2	PRG1 ist spezifisch in Neuronen exprimiert	45
4.1.3	PRG1-Expression während der Entwicklung des ZNS in der Maus	47
4.2	Zelluläre Lokalisationsanalysen	51

4.2.1	Lokalisationsstudien von PRG1 in primären hippocampalen Neuronen	51
4.2.2	PRG1 ist postsynaptisch lokalisiert	59
4.3	Expressionsanalysen der LPA-Rezeptoren während der Gehirnentwicklung der Maus	61
4.4	Lokalisation und Expression der LPA-Rezeptoren in primären hippocampalen Neuronen	63
4.5	LPA führt zum Ca²⁺-Anstieg in hippocampalen Neuronen	70
4.6	Untersuchungen der Signaltransduktion des LPA-vermittelten Ca²⁺-Anstiegs	73
4.7	Inhibierung der Ca²⁺-Kanäle und LPA-induzierte Ca²⁺-Freisetzung	77
4.8	LPA-induziert den Ca²⁺-Anstieg in den präsynaptischen Terminalien	78
4.9	LPA reguliert den Vesikelzyklus	80
4.10	LPA reguliert die exzitatorische Transmission	83
5	Diskussion	87
5.1	PRG1 ist ein Gehirn- und Neuronen-spezifisches Protein	87
5.2	PRG1-Expression während der Gehirnentwicklung der Maus	88
5.3	Lokalisationsanalysen von PRG1 in primären hippocampalen Neuronen	90
5.3.1	Subzelluläre Lokalisation von PRG1 in jungen Neuronen	90
5.3.2	Subzelluläre Lokalisation von PRG1 in reifen Neuronen	92
5.3.3	PRG1 ist ein postsynaptisches Protein	93
5.4	Expressions- und Lokalisationsanalysen der LPA-Rezeptoren	94
5.4.1	Quantitative Expressionsanalysen während der Entwicklung des ZNS	94
5.4.2	Subzelluläre Lokalisation endogener LPA1- und 2-Rezeptoren in unreifen primären Neuronen	96
5.4.3	Subzelluläre Lokalisation endogener LPA1- und 2-Rezeptoren in reifer Neuronenkultur	98
5.5	LPA-induzierte Ca²⁺-Freisetzung in hippocampalen Neuronen	98
5.5.1	Der LPA2-Rezeptor vermittelt die Ca ²⁺ -Freisetzung in Neuronen	98
5.5.2	LPA-induzierte Aktivierung des IP ₃ -Rezeptors wird über das G _i -Protein vermittelt	99
5.5.3	LPA-induziert einen Calciumanstieg in präsynaptischen Terminalien	101
5.5.4	LPA steuert die Freisetzung der synaptischen Vesikel in primären hippocampalen Neuronen	102
5.6	LPA wirkt ausschließlich auf glutamaterge Neurone	103
5.7	Fazit und Ausblick	105
6	Literaturverzeichnis	107
7	Anhang	118
7.1	Lebenslauf	118
7.2	Publikationsverzeichnis	119
Danksagung		120
Eidesstattliche Erklärung		121

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
ATX	Autotaxin
BSA	„Bovine Serum Albumin“
CA1-3	“Cornu ammonis Area 1-3”
DAG	Diacylglycerol
div	“days <i>in vitro</i> ”
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Embryonaltag
eIF1A	Eukaryotischer „Translations-initiations-faktor 1a“
EPSC	“Excitatory postsynaptic current”
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FKS	Fötale Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GSK-3 β	Glykogen Synthase Kinase-3-beta
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
IF	Immunfluoreszenz
IB	Immunblot
Iba1	„Ionized calcium binding adaptor molecule 1“
IPSC	“Inhibitory postsynaptic current”
kDA	Kilodalton
KO	“knock out”
LPA	Lysophosphatidsäure
LPL	Lysophospholipide
LPP	Lipid-Phosphat-Phosphatase
LPR	„Lipid-Phosphatase-related“ Protein
LPT	Lipid-Phosphatasen/Phosphotransferasen
MAG	Monoacylglycerol
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2
mES	Embryonale Mausstammzellen
P	postnataler Tag
PA	Phosphatidat

PB	„Phosphate buffer“
PBS	„Phosphate buffered saline“
PCR	„Polymerase chain reaction“
PFA	Paraformaldehyd
Pgk1	Phosphoglycerat Kinase 1
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PRG	„Plasticity related gene“
PSD95	„Post synaptic density 95“
PTX	Pertussistoxin
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	„Sodium dodecyl sulphate“
SEM	Standardfehler
SV	synaptischer Vesikel
SVZ	Subventrikuläre Zone
Thg	Thapsigargin
TM	Transmembrandomänen
Tuj1	Neuronen-spezifisches Klasse III β -Tubulin
VGAT	Vesikulärer GABA-Transporter
VGLUT1	Vesikulärer Glutamat-Transporter1
VZ	Ventrikuläre Zone
WT	Wildtyp
XeC	Xestospongine C
ZNS	Zentrales Nervensystem

Zusammenfassung

Die Bedeutung bioaktiver Phospholipide wie Lysophosphatidsäure (LPA) wurde in den letzten Jahren intensiv untersucht und zeigte einen essentiellen Einfluss dieser Substanz auf die Entwicklung des zentralen Nervensystems (ZNS). Der extra- und intrazelluläre Phospholipidspiegel wird durch Enzyme reguliert, welche die Synthese- und Degradationsreaktionen dieser Moleküle katalysieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Plasticity related gene 1 (PRG1), ein Protein, das die hippocampale Erregbarkeit über die Regulation des LPA-Spiegels moduliert, untersucht. Parallel dazu wurden die LPA-bindenden Rezeptoren im Gehirn und differenzierten Neuronen analysiert und der Einfluss von LPA auf hippocampale Neurone *in vitro* untersucht.

PRG1 wurde im Rahmen einer Suche nach neuen Proteinen, welche mit der Regeneration des ZNS assoziiert sind, entdeckt. Gegenstand der hier vorliegenden Arbeit waren weiterführende Untersuchungen zur Expression, Lokalisation und potentieller Funktion von PRG1. Untersuchungen mittels quantitativen Real-Time-PCR zeigten, dass die Expression von PRG1 im Hippocampus und Neocortex entwicklungsabhängig reguliert ist und das maximale mRNA-Niveau zum Zeitpunkt der Synaptogenese erreicht. Detaillierte subzelluläre Analysen an hippocampalen Neuronen *in vitro* ermöglichten einen Einblick in die Lokalisation von PRG1 während der zellulären Ausdifferenzierung. Es konnte in vorliegender Arbeit gezeigt werden, dass das PRG1 in jungen Neuronen eine homogene Verteilung in der Plasmamembran aufweist und sowohl in Lamellipodien als auch in Filopodien der Neurite vorhanden ist. In späteren Reifestadien konnte eine spezifische Lokalisation im Dendritenschaft beobachtet werden. Besonders intensiv wurde das PRG1 in Spines der ausgereiften Neuronen vorgefunden. Aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten kann angenommen werden, dass PRG1 während neuronaler Entwicklung in die Prozesse der Synapto- und Spinogenese involviert sein könnte. *In vitro*-Untersuchungen lassen auf eine mögliche Beteiligung von PRG1 an Stabilisierung, Konsolidierung oder Wegfindung der Neuriten schließen. Als Membranprotein könnte PRG1 auf extrinsische Faktoren, wie z. B. LPA reagieren und Signale intrazellulär weiterleiten.

In weiteren Untersuchungen während dieser Arbeit wurden Rezeptoren analysiert, welche LPA als spezifischen Liganden binden. Gegenwärtig sind fünf LPA-Rezeptoren bekannt. Die LPA-Rezeptoren gehören zu der Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und regulieren vielseitige intrazelluläre Prozesse nach ihrer Aktivierung. In dieser Arbeit wurde mit der sensiti-

ven und quantitativen Real-Time-PCR zum ersten Mal gezeigt, dass LPA3- und LPA5-Rezeptoren im Gehirn nicht exprimiert werden. Aufgrund ähnlicher oder identischer intrazellulärer Signalkaskaden ist bis heute noch nicht klar, welche Rolle jedem einzelnen Rezeptor zukommt. Detaillierte Analysen der LPA-Rezeptor Expression während der neuronalen Entwicklung zeigten, dass die LPA1- und LPA2-Rezeptoren eine Dominanz in primären hippocampalen Neuronen aufweisen. Funktionsanalysen an primären hippocampalen Neuronen *in vitro* zeigten ferner, dass LPA einen Anstieg der intrazellulären Calciumtransienten auslöst. Zum ersten Mal wurde demonstriert, dass dieser Effekt allein auf den LPA2-Rezeptor zurückzuführen ist. Weiterhin geht dieser Effekt mit der Exozytose synaptischer Vesikel einher und beschränkt sich ausschließlich auf die glutamaterge Transmission. In dieser Arbeit konnte somit erstmalig präsentiert werden, dass LPA die exzitatorische Transmission, spezifisch über den LPA2-Rezeptor, reguliert.

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Daten sind ein Beitrag zum Verständnis der Funktionen von PRG1, LPA und LPA-Rezeptoren im ZNS.

Summary

Extensive research into the role of bioactive phospholipids such as lysophosphatidic acid (LPA) over recent years has shown them to be essential in the development of the central nervous system (CNS). Extra- and intracellular phospholipid levels are regulated by enzymes that catalyze the synthesis and degradation reactions of lysophospholipids. This study examined plasticity-related gene 1 (PRG1), a protein that mediates hippocampal excitability by regulating LPA levels and which was discovered as part of a search for new proteins involved in regeneration of the CNS. An additional focus was the analysis of LPA-binding receptors in the brain and differentiated neurons, and the effect of LPA on primary neurons *in vitro*.

Investigation by means of quantitative Real-time PCR showed that the expression of PRG1 in the hippocampus and neocortex is dependent on development and reaches maximum mRNA levels at the time of the synaptogenesis. Cellular analyses of primary hippocampal neurons *in vitro* showed the localization of PRG1 during cellular maturation. PRG1 was found to display homogeneous distribution in the plasma membrane of young neurons and exist in lamellipodia and filopodia of the neurites. At later maturation stages, specific localization was observed in the dendrites. PRG1 was found at especially high levels in spines of mature neurons. This data suggests that PRG1 could be involved in synapto- and spinogenesis during neural development. *In vitro* investigation also indicates that PRG1 could participate in stabilisation, consolidation and pathfinding of the neurites. As a membrane protein, PRG1 possibly reacts to extrinsic factors such LPA and passes these signals on into the cell.

In additional experiments, receptors that bind LPA as a specific ligand were analyzed. Five LPA receptors have been identified to date. They belong to the G protein-coupled receptor class and regulate a great number of cellular processes. In this part of the study, quantitative Real-time PCR demonstrated for the first time that the LPA3 and LPA5 receptors are not expressed in the brain. Due to the fact that the cellular signal cascades of these receptors are in some cases identical, their individual roles are as yet unclear. Detailed analyses of LPA receptor expression during neural development showed that the LPA1 and LPA2 receptors dominate in primary hippocampal neurons. Further, functional analyses on hippocampal neurons *in vitro* showed that LPA leads to an increase in intracellular calcium. This effect was traced back to the LPA2 receptor. Furthermore, the experiments demonstrated that LPA-induced calcium increase

modulates the exocytosis of synaptic vesicles and is limited to glutamatergic transmission. This work shows that LPA regulates excitatory transmission specifically through activation of the LPA2 receptor in primary hippocampal neurons.

The data generated within this work contribute to the understanding of the functions of PRG1, LPA and LPA receptors in the CNS.

1 Einleitung

Millionen Jahre brauchte die Evolution, um in der Tierwelt die anfangs sehr einfachen Nervensysteme zum Gehirn, in all seiner Komplexität, zu entwickeln. Die Ausführung komplexer motorischer, sensorischer und kognitiver Leistungen kann nur durch ein in seiner Struktur und Funktion intaktes zentrales Nervensystem (ZNS) geleistet werden. Unzählige extrinsische und intrinsische Faktoren sowie molekulare Mechanismen sind an Prozessen der neuronalen Entwicklung beteiligt.

1.1 Lysophosphatidsäure im zentralen Nervensystem

Lysophosphatidsäure (LPA, Abbildung 1) ist ein aktives Glycerophospholipid, welches als extra- und intrazelluläres Signalmolekül agiert. Biologische Prozesse wie Neurogenese, Angiogenese, Wundheilung, Immunität und Karzinogenese werden von LPA beeinflusst [1, 2]. Grundlegende zelluläre Funktionen, wie z. B. Zellproliferation, Differenzierung von Keratinozyten, Reorganisation des Cytoskeletts, Migration, Zell-Zellaggregation, Kontraktion glatter Muskelzellen und Schutz vor Apoptose, werden von LPA gesteuert [3-7]. LPA wurde in unterschiedlichen biologischen Flüssigkeiten wie z. B. Serum, Plasma, Speichel, und Hühnerei-Eiweiß [8-12] sowie im Gewebe und im Gehirn nachgewiesen [13]. Im Serum kommt LPA in Albumin-gebundener Form vor, wo ihre physiologische Konzentration 1-20 μM beträgt [14, 15]. Intrazelluläres LPA ist an das *fatty acid binding protein* (FABP) gebunden [16].

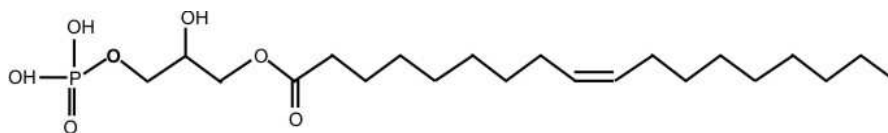


Abbildung 1: Chemische Strukturformel von LPA.

Oleoyl-Lysophosphatidsäure oder acyl-LPA (18:1).

Umfangreiche biologische Studien enthüllten eine wichtige Rolle von LPA während der Entwicklungsprozesse des ZNS wie z. B. das Wachstum und die Faltung des cerebralen Cortex [19] und seine Funktion [17, 18]. *In vivo*-Applikation von LPA in adultes Maus-Striatum indu-

zierte Astrogenese, wie sie während einer Hirnschädigung beobachtet wird [20]. Junge postmitotische Neurone aus dem Neocortex der Maus, neuronale Zelllinien wie N1E-115, NG108-15 und differenzierte PC12-Zellen reagierten mit einer starken Retraktion der Neuriten und Wachstumskegelkollaps auf exogenes LPA [21-24]. LPA führt auch zu einem RhoA-abhängigen Kollaps des Wachstumskegels in Neuronen aus dem Hinterwurzelganglion (*dorsal root ganglion*) und in spinalen Neuronen aus *Xenopus* [25, 26]. Eine andere Studie zum Wirkungsmechanismus von LPA brachte Hinweise, dass LPA einen Kollaps der Neuriten retinaler Ganglionneurone über eine schnelle Proteindegradation im Wachstumskegel bewirkt; diese ging mit der Aktivierung der Proteasomen p38, MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) und Caspase-3 einher [27, 28]. Weitere *in vitro*-Studien an Oligodendrozyten zeigten LPA-abhängige Effekte wie Mobilisierung von Ca^{2+} , Erk1/2-Phosphorylierung und Zellrundung [29-31]. Microgliazellen zeigten ebenfalls LPA-spezifische Reaktionen wie Ca^{2+} -Mobilisierung, Proliferation, Reorganisation des Cytoskeletts und Expression von BDNF (*Brain-Derived-Neurotrophic-Factor*) [32-34]. Sogar eine Freisetzung des Neurotransmitters Dopamin wurde als Folge einer LPA-Stimulation in PC12-Zellen beobachtet [35]. Zusätzlich werden neurologische Störungen wie Schizophrenie und neuropathischer Schmerz mit LPA in Verbindung gebracht [18, 36-39]. Solche Beobachtungen unterstreichen erneut die Wichtigkeit von LPA für die physiologischen Entwicklungsprozesse sowie den möglichen pathologischen Einfluss dieses Moleküls auf das ZNS.

1.2 Biosynthese und Metabolismus von LPA

Die Mechanismen der LPA-Synthese sind noch immer nicht vollständig aufgeklärt. Klar ist aber, dass unterschiedliche Enzyme daran beteiligt sind. Zwei mögliche Synthesewege wurden in den letzten Jahren postuliert.

Der erste Syntheseweg beschreibt eine Umwandlung der Lysophospholipide (LPL) aus der Plasmamembran der aktivierten Blutplättchen über die Phospholipase D-Aktivität (LysoPLD) des Autotaxins (ATX) in LPA durch Hydrolyse der terminalen Phosphodiesterbindung. ATX konnte wie LPA in den meisten biologischen Flüssigkeiten nachgewiesen werden und ist wahrscheinlich der primäre Produzent von extrazellulärem LPA [40]. Neueste Studien zeigten eine starke Korrelation zwischen ATX- und LPA-Präsenz im Serum. Während die Embryonen von ATX-defizienten Mäusen am embryonalen Tag 10 (E10) sterben, waren die heterozygoten Mäuse dagegen lebensfähig, wiesen aber nur die Hälfte der LPA-Konzentrationen im Plasma im Ver-

gleich zu Wildtyp-Tieren auf [41, 42]. Diese Befunde verdeutlichen erneut die grundlegende Bedeutung von ATX für die LPA-Synthese. Eine weitere Möglichkeit, extrazelluläres LPA zu synthetisieren, wurde über eine sekretierte, proinflammatorisch aktivierte Phospholipase A2 beschrieben [43].

Zusätzlich zu dem extrazellulären LPA-Syntheseweg existiert auch die Möglichkeit zur intrazellulären LPA-Produktion. Hierbei wird LPA durch Deacylierung von Phosphatidsäure (PA) durch Phospholipase A1 oder A2 generiert [44, 45]. Darüber hinaus kann die Synthese über die in Mitochondrien oder im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisierte Glycerophosphat-Acetyltransferase erfolgen, indem Glycerol-3-Phosphat zu LPA acyliert wird [46].

Unter physiologischen Bedingungen wird intrazelluläres LPA über die LPA-Acyltransferase (LPA-AT) in PA umgewandelt und extrazellulär über die Lipid-Phosphat-Phosphatasen in Monoacylglycerol (MAG) hydrolysiert [47, 48] (Abbildung 2).

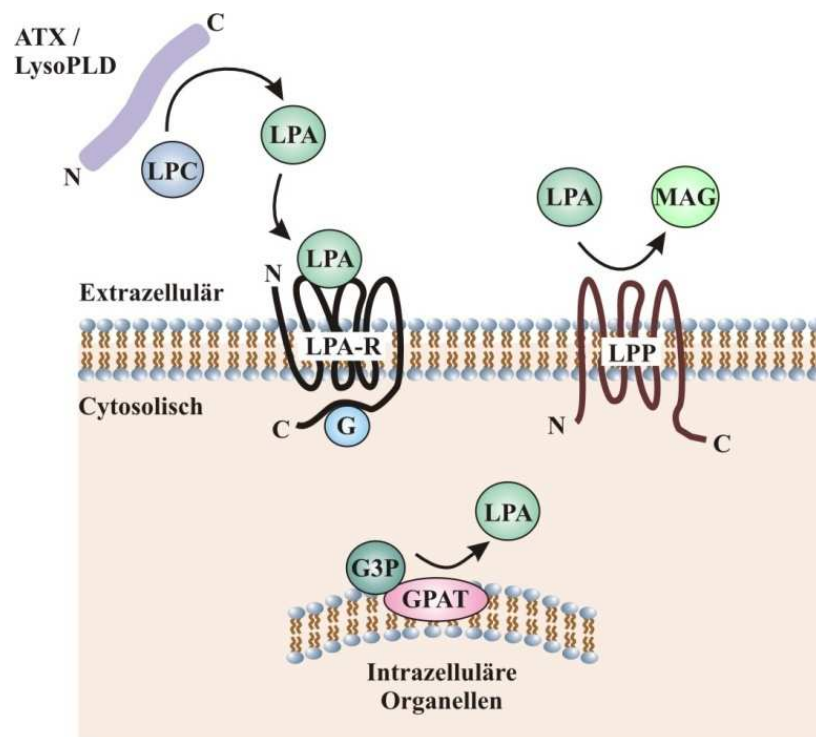


Abbildung 2: Biosynthese und Regulationsmechanismen der Lysophosphatidsäure.

Die extrazelluläre LPA-Synthese erfolgt primär durch Autotaxin (ATX) über die Phospholipase D-Aktivität (LysoPLD) aus Lysophospholipiden wie z. B. Lysophosphatidylcholin (LPC) und der Abbau durch Lipid-Phosphat-Phosphatasen (LPPs) zu Monoacylglycerol (MAG). Intrazellulär erfolgt die Synthese durch an ER- oder Mitochondrienmembranen gebundene Glycerophosphat-Acetyltransferase (GPAT) aus Glycerol-3-Phosphat (G3P). Modifiziert nach [49].

1.3 LPA-Rezeptoren und ihre Signaltransduktion

Die durch LPA hervorgerufenen Effekte werden über die Bindung an spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt. Die Signalkaskaden der LPA-Rezeptoren sind sehr komplex und vielseitig. Jeder Rezeptor ist in der Lage, aufgrund bindender G-Proteine diverse intrazelluläre Reaktionen hervorzurufen. Abbildung 3 zeigt eine Zusammenfassung der durch LPA aktivierten intrazellulären Signalwege.

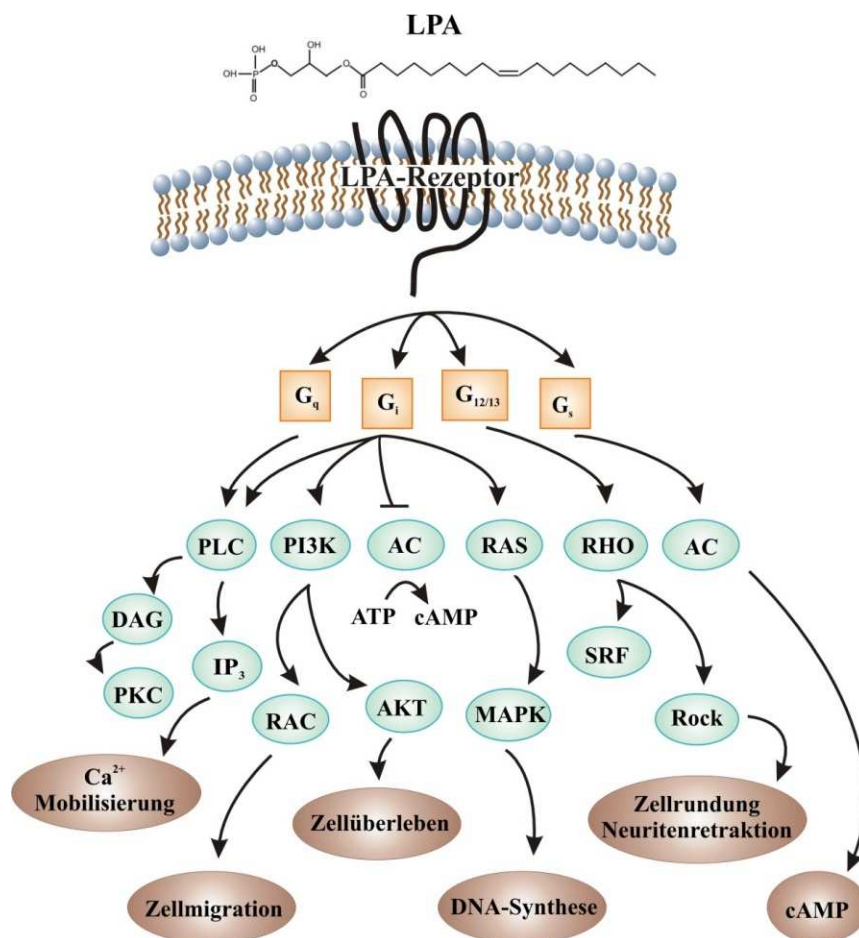


Abbildung 3: Signaltransduktion der aktivierten LPA-Rezeptoren.

AC – Adenylatzyklase, cAMP – cyclisches Adenosinmonophosphat, DAG – Diacylglycerol, IP₃ – Inositol-1,4,5-triphosphat, MAG – Monoacylglycerol, MAPK – *Mitogen-activated protein kinase*, PI3K – Phosphatidylinositol-3-Kinase, PKC – Protein Kinase C, PLC – Phospholipase C, Rho, Rac – kleine GTPasen, Rhok – Rho Kinase, SRF – *Serum response Faktor*. Modifiziert nach [50].

Die ersten drei entdeckten LPA-Rezeptoren trugen ursprünglich den Namen *Endothelial Differentiation Gene* (EDG). Der Name leitet sich vom ersten Mitglied der Familie ab, das aus

Endothelzellen isoliert wurde. Gegenwärtig sind fünf Rezeptoren bekannt. Sie werden entsprechend ihres bindenden Liganden mit LPA1 bis LPA5 bezeichnet [4, 51-55]. Untersuchungen der letzten zwei Jahre identifizierten zwei weitere Rezeptoren, die vermutlich über LPA aktiviert werden. Allerdings sind weitere Studien notwendig, um diese Hinweise zu bestätigen [56-58].

Zu der EDG-Familie gehören die LPA1-, LPA2- und LPA3-Rezeptoren, deren humane Aminosäuren- (AS)-Sequenzen zu 50-57 % identisch sind [50]. Der humane LPA4-Rezeptor besitzt nur 20-24 % Sequenzähnlichkeiten zu den EDG-Rezeptoren und ist verwandt mit den purinergen P2Y-Rezeptoren [51, 59, 60]. Mit 35 % Identität in der humanen und murinen AS-Sequenz ist der GPR92/93-Rezeptor dem LPA4 verwandt und wurde aufgrund seiner ähnlichen Struktur als fünfter LPA-Rezeptor anerkannt [54, 55]. Auch an diesem Rezeptor konnten LPA-typische Reaktionen wie Retraktion der Neuriten, Mobilisierung des intrazellulären Calciums, Internalisierung des Rezeptors und Inhibierung der Adenylatcyclase nachgewiesen werden [54].

Mittlerweile wurden verschiedene LPA-Rezeptor-*knock out* (KO)-Mäuse generiert, welche zur Aufklärung der physiologischen und pathologischen Funktion der Rezeptoren eingesetzt wurden. Tabelle 1 gibt einen Überblick des aktuellen Wissensstandes über LPA-vermittelte zelluläre Effekte sowie an die LPA-Rezeptoren bindende G-Proteine.

Tabelle 1: Charakterisierung der LPA-Rezeptoren.

Rezeptor	Synonym	Bindende G-Proteine	Zellreaktion	Physiologische/pathologische Funktion	Knock out-Phänotyp
LPA1	VZG-1 EDG2 GPR26	G _{ai/o} G _{aq/11} G _{α12/13}	Proliferation [61], Stressfaserformation [61], Neuritenretraktion [4, 61, 62], Zellrundung [62], Zellüberleben [63], Calciummobilisierung [35]	Gehirnentwicklung [17, 64], neuropathischer Schmerz [36], pulmonale Fibrose [65], renale Fibrose [66]	50 % perinatale Letalität [17, 37], Reduktion des Körpergewichts und der Gehirnmasse, kraniofaziale Dismorphismen, verkürzte Schnauze, unausgeprägter Sauginstinkt [37, 67] vaskuläre Schädigung [68]
LPA2	EDG4	G _{ai/o} G _{aq/11} G _{α12/13}	Zellrundung [62], Calciummobilisierung [35], Neuritenretraktion [4, 61, 62]	indirekter Effekt auf neuronale Differenzierung, corticaler Wachstum [19, 69, 70]	keine Abnormalitäten [69] LPA1/LPA2-KO; Phänotyp wie in LPA1-KO
LPA3	EDG7	G _{ai/o} G _{aq/11}	Neuritenelongation [62]	Spermatogenese, embryonale Einnistung [71]	verspätete embryonale Einnistung, kleine Würfe [72]
LPA4	GPR23/ P2Y9	G _{ai/o} G _{aq/11} G _{α12/13} G _{as}	Neuritenretraktion, Neuritenelongation, Zellrundung, Zellaggregation [73, 74]	nicht bekannt	keine Abnormalitäten [74]
LPA5	GPR92/93	G _{aq/11} G _{α12/13}	Stressfaserformation, Neuritenretraktion, Zellrundung [54]	nicht bekannt	nicht vorhanden

Die Expression des LPA1-Rezeptors wurde in fast jedem murinen und humanen Gewebe und innerhalb der ventrikulären Zone (VZ) des embryonalen Gehirns gezeigt [4, 61, 69]. Der LPA2-Rezeptor wurde zu unterschiedlichen Intensitäten in jedem murinen Gewebe nachgewiesen. Ebenfalls wurde die Expression des LPA2-Rezeptors im embryonalen Gehirn gezeigt [3]. Der LPA3-Rezeptor wurde in mehreren Geweben nachgewiesen, die stärkste Expression jedoch in den Fortpflanzungsorganen gezeigt [3]. Die LPA4- und 5-Rezeptoren besitzen ein breites Expressionsspektrum innerhalb unterschiedlicher Gewebe in der Maus [53-55].

1.4 PRG1 moduliert LPA-Signaltransduktionsmechanismen

Kürzlich wurde ein neues Protein entdeckt, welches in der Lage zu sein scheint, Phospholipide wie LPA zu binden und/oder zu modifizieren. Bei diesem Protein handelt es sich um „plasticity related gene 1“ (PRG1). Es wird vermutet, dass PRG1 eine Art LPA-Rezeptor/Transporter oder ein LPA-modifizierendes Protein ist [75-77]. Die genaue Funktion von PRG1 in LPA-abhängigen Signalvorgängen und das Zusammenspiel beider Moleküle sind bis heute noch nicht vollständig verstanden.

Die Entdeckung von PRG1 erfolgte unter Verwendung eines entorhinal-hippocampalen Läsionsmodells. PRG1 und andere entdeckte Gene waren während des axonalen Wachstums und der regenerativen Prozesse verstärkt exprimiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass eines dieser Gene nach entorhinaler Cortexläsion spezifisch im Hippocampus und entorhinalen Cortex in seiner Expression hochreguliert war [76]. Diese Entdeckung deutete darauf hin, dass dieses Gen eine besondere Rolle bei der Regeneration nach einer Schädigung und bei plastischen Umbauprozessen des Gehirns spielt, weshalb es die Bezeichnung „plasticity related gene 1“ (PRG1) erhielt [76]. Mittels Northern Blot wurde nachgewiesen, dass PRG1 spezifisch im Gehirn exprimiert wird. Die *in situ*-Hybridisierung zeigte, dass seine Expression erst ab Embryonaltag 19 (E19) in der hippocampalen Anlage beginnt und im postnatalen Gehirn hochreguliert wird. Das Transkript wurde postnatal in den Körner- und Pyramidenzellen des Gyrus dentatus und des Cornu Ammonis des Hippocampus und entorhinalen Cortex detektiert. Darüber hinaus wurden *in silico*-Analysen durchgeführt und weitere vier Gene im humanen Genom entdeckt, die homolog zu PRG1 sind (PRG2-5). Alle 5 PRGs sind in Säugetieren hoch konserviert und kommen phylogenetisch nur in Vertebraten vor [76].

PRG1 besteht aus 766 AS und besitzt, wie aufgrund von Hydrophobizitätsanalysen vermutet wird, sechs Transmembrandomänen (TM) sowie drei extrazelluläre *Loops*. Dabei sind sowohl der Amino- (N)-Terminus, als auch der 400 AS lange Carboxy- (C)-Terminus intrazellulär lokalisiert (Abbildung 4 A). Mittels *in silico*-Analysen wurde vorhergesagt, dass innerhalb der Familie nur PRG1 und PRG2 einen so langen hydrophilen C-Terminus besitzen, deren Sequenz keine Homologien zu anderen bekannten Proteinen aufweist. Weitere Sequenzvergleiche zeigten, dass die ersten 300 AS des N-Terminus zu Lipid-Phosphatase/Phosphotransferasefamilie der LPP-Proteine (*lipid phosphate phosphatases*) wie in Wunen, einem in *Drosophila* vorkommenden mammalian LPP-Homolog, hoch konserviert sind [78]. Aufgrund dieser Homologien werden PRGs auch als LPRs (*lipid phosphatase related proteins*) bezeichnet. Charakteristisch für LPPs ist, dass sie drei extrazellulär lokalisierte katalytische Domänen besitzen, welche Phospholipide wie z. B. LPA hydrolysieren können [79].

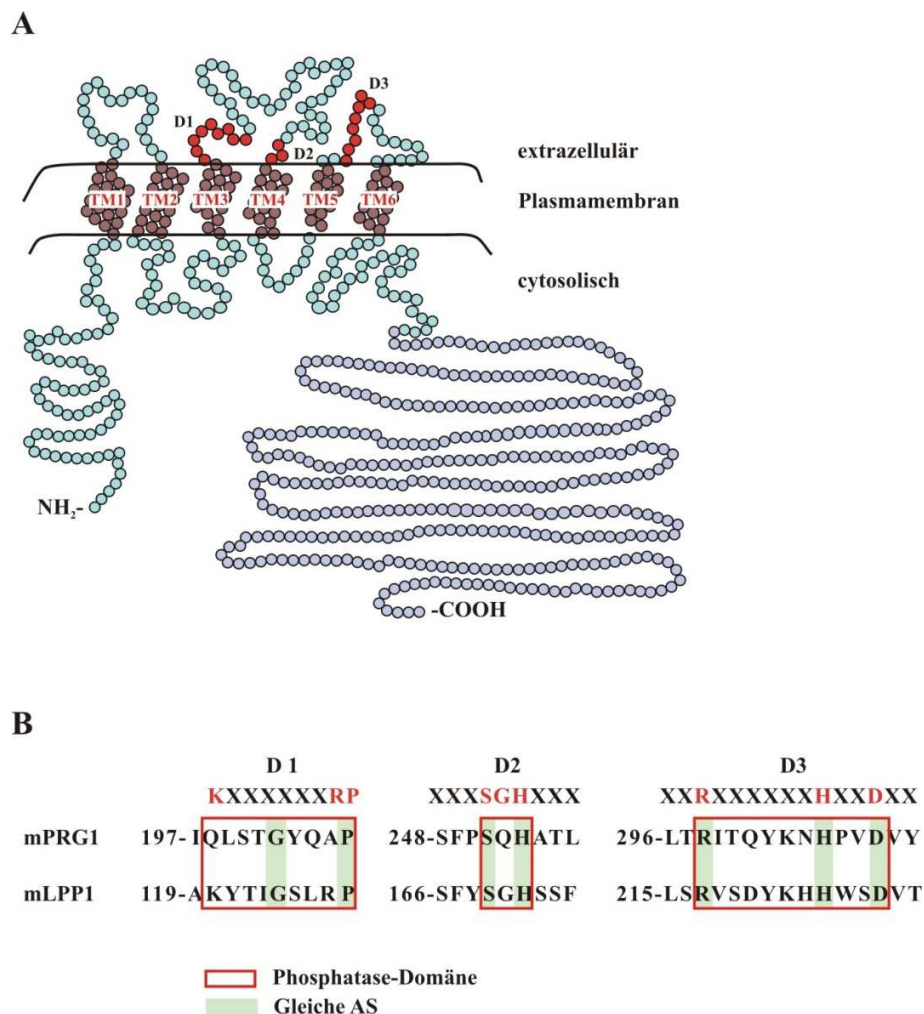


Abbildung 4: Schematische Darstellung von PRG1 und AS-Vergleich der potentiellen Phosphatase-Domänen.

A: PRG1-Strukturmodell basierend auf dem LPP-Strukturmodell, modifiziert nach [80]. PRG1 besitzt sechs Transmembrandomänen (TM1-6). N-Terminus und C-Terminus sind intrazellulär lokalisiert. Die katalytischen Domänen (D1-D3) auf den extrazellulären *Loops*, welche bei LPPs zur Interaktion mit Lipidphosphaten führen, sind rot markiert. **B:** Vergleich der AS-Sequenz innerhalb der Phosphatase-Domänen zwischen Maus-PRG1 und Maus-LPP1. Die für die Phosphataseaktivität essentiellen AS sind rot dargestellt [79, 80]. Sie sind in PRG1 nur teilweise konserviert (K –Lysin zu Q – Glutamin, R –Arginin zu A –Alanin und H – Histidin zu N – Asparagin).

Obwohl PRG1 Sequenzähnlichkeiten zu LPPs aufweist, fehlen diesem Protein einige der konservierten AS in Positionen, welche wichtig sind für die funktionelle Integrität der katalytischen Domänen der LPPs [80]. Beispielsweise fehlen allen PRGs die Aminosäuren Lysin und Arginin in der Domäne 1 und Histidin in der Domäne 3 (Abbildung 4 B). Aufgrund des Austausches einiger funktionellen, für die Phosphataseaktivität bedeutsamen AS im Vergleich von LPPs zu PRGs wurde postuliert, dass dieses Protein keine Dephosphorylierungsreaktionen durchführen

kann. Es wird vermutet, dass PRG1 über andere, bis jetzt nicht vollständig aufgeklärte, Mechanismen in die LPA-Signaltransduktion modulierend eingreift [75].

So wurde in früheren Untersuchungen nachgewiesen, dass eine Überexpression von PRG1 in der Neuroblastoma-Zelllinie, N1E-115, den LPA-induzierten Neuritenkollaps hemmen konnte. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass PRG1-eGFP-Fusionsprotein überexprimierende N1E-115-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen die 5-fache Menge an MAG als LPA-Degradationsprodukt im Überstand aufweisen [76]. Dieser Effekt wurde allerdings aufgehoben, sobald das Histidin in der Domäne 2 mittels gerichteter Mutagenese zu einem Lysin (H253K) mutierte. Eine solche Mutation im Phosphatase-Motiv in Maus-LPP1 oder Wunen bewirkte einen vollständigen Verlust der Phosphataseaktivität [80, 81]. Die in Zusammenarbeit entstandenen und von Trimbuch *et al.* (2009) mittlerweile publizierten Daten zeigten, dass PRG1 eine Interaktion mit bioaktiven Phospholipiden eingeht. Dies wurde durch Studien an PRG1-defizienten Neuronen und fluoreszenz-markierter Phosphatidsäure nachgewiesen. Die Aufnahmefähigkeit solcher Moleküle war bei PRG1-KO-Neuronen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen um 50 % reduziert [77].

Phänotypische Charakterisierungen einer solchen PRG1-KO-Maus zeigten signifikante Gewichtsunterschiede im Vergleich zu Wildtyp-Tieren, was auf eine Beeinträchtigung in der Entwicklung hindeutet. Die homozygoten Tiere zeigten sogar eine Mortalitätsrate von etwa 50 % in den ersten 3-4 Lebenswochen. Bei PRG1-KO-Tieren wurden am postnatalen Tag 20 (P20) Zuckungen beobachtet, welche epileptischen Anfällen ähnlich waren. Daraufhin durchgeführte elektrophysiologische Untersuchungen in hippocampalen Schnitten der juvenilen PRG1-KO-Mäuse wiesen eine signifikant höhere Erregbarkeit und eine höhere mEPSC (*excitatory postsynaptic current*) Frequenz, jedoch keine Veränderung der mIPSC (*inhibitory postsynaptic current*) Frequenz auf [77]. Die spontanen konvulsiven Anfälle in PRG1-KO-Mäusen deuten darauf hin, dass PRG1 an den Vorgängen der neuronalen Transmission beteiligt sein müsste.

1.5 Grundlagen der synaptischen Transmission

Jedes Neuron steht durchschnittlich mit mehreren tausend anderen Nervenzellen in direkter Verbindung. So entsteht ein Geflecht von ungeheurer Komplexität mit mehreren hundert Billionen Kontakten. Solche synaptischen Kontakte ermöglichen die geordnete Signalübertragung und Verarbeitung von Informationen.

Ein typisches Neuron besteht aus einem Zellkörper (Soma), welchem zwei Arten von Fortsätzen entspringen: Das Axon und mehrere Dendriten (Abbildung 5). Die große Oberfläche der Dendriten erlaubt dem Neuron, Signale von anderen Nervenzellen aufzunehmen und zu verarbeiten. Die Signalübertragung erfolgt über das Axon, welches am Axonhügel des Somas entspringt und sich in seinem Verlauf in Kollateralen aufteilt. Am Ende des Axons befinden sich die Synapsen, über welche eine Verbindung zum Soma, zu den Dendriten oder zum Axon des nächsten Neurons aufgenommen wird. Die Synapsen bilden die Kontaktstellen zu anderen Neuronen, zu Muskelzellen oder zu Drüsenzellen.

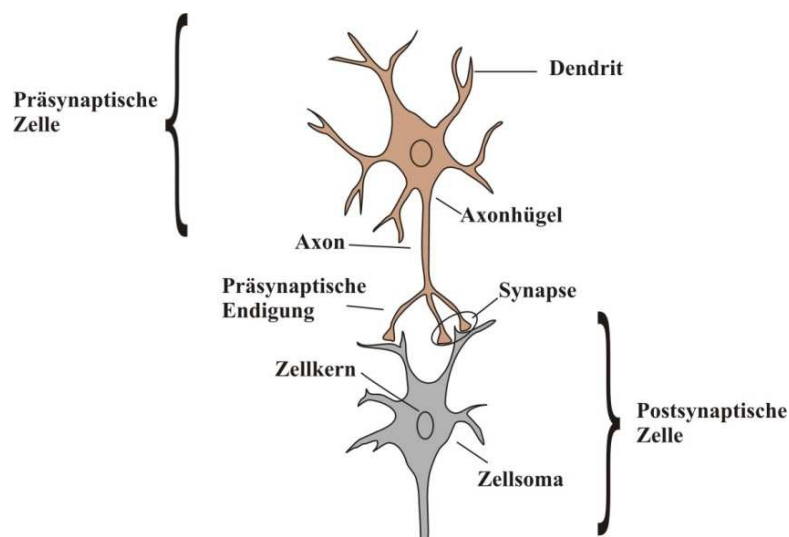


Abbildung 5: Schematische Darstellung einer synaptischen Verschaltung zweier Neurone.

Eine Nervenzelle besteht aus einem Zellsoma, in dem sich der Zellkern befindet, einem Axon und mehreren Dendriten. Chemische Reize von einer präsynaptischen Zelle werden an die Synapse der postsynaptischen Zelle übermittelt. Hierfür kommen sich die präsynaptischen Endigungen und die Dendriten nahe und werden lediglich durch einen synaptischen Spalt voneinander getrennt. Änderungen des Membranpotentials an Dendriten durch synaptische Reize werden am Axonhügel integriert. Sobald ein Schwellenwert überschritten wird, wird ein Aktionspotential ausgelöst, welches am Axon entlang wandert und an der synaptischen Endigung zur Ausschüttung der Botenstoffe führt. Modifiziert nach (Kandel, Schwartz und Jessel, 2000)

Im Axonhügel, entsteht nach einem „Alles-oder-Nichts-Prinzip“ ein Aktionspotential, sobald ein bestimmter Schwellenwert überschritten wird. Dieses Aktionspotential wird bis zu den Nervenendigungen geleitet und führt zu einer Depolarisation, welche das Öffnen der spannungsabhängigen Calciumkanäle bewirkt. Durch die geöffneten Kanäle kommt es zu einem Calciumeinstrom ins Cytoplasma. Erhöhte Konzentration freier Calciumionen im Cytoplasma aktivieren molekulare Mechanismen, welche zu einer Verschmelzung von präsynaptischen, sekretori-

schen Vesikel mit der präsynaptischen Membran an der aktiven Zone führen [82]. Solche sekretorischen Vesikel sind mit Neurotransmittern gefüllt, welche über Exozytose in den synaptischen Spalt freigesetzt werden und so das elektrische Signal in ein chemisches umsetzen. Nach der Freisetzung der Neurotransmitter werden die Vesikel über Endocytose wieder in die Präsynapse aufgenommen, dort mit Neurotransmittermolekülen aufgefüllt und in den Reservepool transportiert oder recycelt [82]. Der Zyklus der synaptischen Vesikel (SV) in der präsynaptischen Endigung ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt.

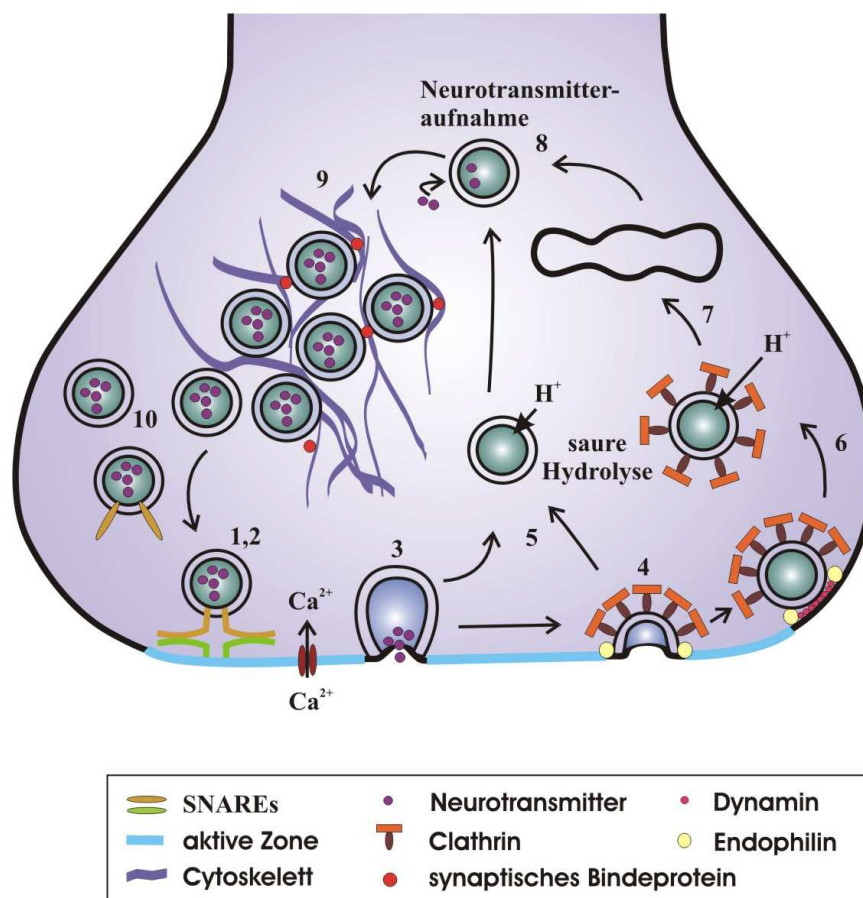


Abbildung 6: Zyklus synaptischer Vesikel.

Schematische Darstellung des synaptischen Vesikelzyklus in der präsynaptischen Endigung. 1 und 2 - Anlagerung und Vorbereitung zur Exozytose des SV; 3 - Fusion/Exozytose; 4 - Endozytose; 5 - schnelles Recycling ohne Endosomen; 6 - Clathrin-vermittelte Knospung und Ausbildung des Vesikels; 7 - SV-Recycling in synaptischem Endosom; 8 - Neurotransmitteraufnahme; 9 - Speicherung der gefüllten SV durch Bindung an das Cytoskelett, z. B. durch Synapsine; 10 - Mobilisierung an die Plasmamembran. Modifiziert nach [82, 83].

Die freigesetzten Botenstoffe diffundieren bis zur postsynaptischen Membran und binden an die dort lokalisierten Ionenkanalrezeptoren (ionotrop) oder an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (metabotrop) und bewirken somit eine Reizübertragung. Die freigesetzten Neurotransmitter werden entweder im synaptischen Spalt hydrolysiert oder wieder in die Präsynapse aufgenommen. Dort wird der Transmitter über einen spezifischen Transporter, der in der Membran des synaptischen Vesikels verankert ist, in das Vesikel aufgenommen und gespeichert [82].

1.6 Ca^{2+} -abhängige Neurotransmission

Intrazelluläres Calcium hat erstaunlich viele regulatorische Funktionen in eukaryotischen Zellen, wie beispielsweise eine Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen Enzymen, Gentranskription und Kontraktion. In Nervenendigungen löst intrazellulärer Ca^{2+} -Einstrom, vermittelt durch die Öffnung der spannungsgesteuerten Calciumkanäle, nach dem Erreichen des Aktionspotentials eine Fusion der Vesikel mit der präsynaptischen Plasmamembran aus [84-86]. Dabei wirkt Calcium wahrscheinlich als *Trigger*-Reiz für das vesikuläre Protein Synaptotagmin, welches wiederum, zusammen mit dem ebenfalls vesikulären Synaptobrevin und den beiden zellmembranständigen Proteinen Syntaxin und SNAP-25, die Verschmelzung der Vesikel mit der präsynaptischen Membran und dadurch letztlich die Freisetzung der darin enthaltenen Transmitterquanten in den synaptischen Spalt ermöglicht [87, 88]. Es wird angenommen, dass durch die Bindung der Calciumionen an die C2-Domäne des Synaptotagmins eine positive Krümmung der Membran erreicht und so die Exocytose erleichtert wird [89]. Die Stimulierung der vesikulären Fusion kann schon bei Calciumkonzentrationen von 10-25 μM auftreten, allerdings kann die lokale Konzentration des Calciums in einer aktiven Synapse bis zu 200 μM ansteigen [85, 86].

Während der Ca^{2+} -abhängigen Neurotransmission spielen die spannungsabhängigen Calciumkanäle, die eine kontrollierte Aufnahme von Calciumionen in Zellen ermöglichen, eine zentrale Rolle. Sie setzen eine Änderung der Membranspannung in ein chemisches intrazelluläres Signal um. Mehrere Typen spannungsgesteuerter Calciumkanäle werden im ZNS exprimiert. Ihre Funktion richtet sich nach zellulärer und subzellulärer Verteilung, biophysischen und pharmakologischen Eigenschaften sowie physiologischer Rolle [90]. Die häufigsten Calciumkanal-Subtypen in präsynaptischen Nervenendigungen sind der P/Q-Typ ($\text{Ca}_v2.1$) und N-Typ ($\text{Ca}_v2.2$), während der genetisch verwandte R-Typ ($\text{Ca}_v2.3$) und der wenig verwandte L-Typ (Ca_v1) in Prozessen der synaptischen Transmission kaum involviert sind [91, 92]. Die Forschungen der letzten

Jahre zeigten deutlich, dass die Calciumkanäle nicht als einsame Mitspieler im komplexen Prozess der Neurotransmission angesehen werden können. Indizien wie Interaktionen mit Proteinen, welche an der Vesikelfusion beteiligt sind, Calcium-bindenden Proteinen und Interaktionen mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, sind bereits beschrieben worden [90].

1.7 Lipidregulation der Vesikelexozytose und –Endozytose

Physiologische und mikroskopische Methoden haben gezeigt, dass aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation und Fusionbereitschaft mindestens vier Vesikelpopulationen in der Präsynapse definiert werden können. Als „Reserve Pool“ werden Vesikelansammlungen bezeichnet, welche an das Cytoskelett gebunden sind und sich in einem gewissen Abstand zu der Plasmamembran befinden. Sie stehen bereit, um aktiv an die Membran überführt und dort verankert zu werden [93]. Um mit der Membran zu verschmelzen, müssen die Vesikel zunächst fusions-kompetent gemacht werden. Die an der Plasmamembran verankerten, aber nicht fusions-kompetenten Vesikel bilden den sogenannten *unprimed pool* (UPP) [94]. Nach einem Stimulus, wie z. B. Ca^{2+} -Einstrom, kommt es zur Vesikelfusion und ein *release ready pool* entsteht. Dieser ist aus zwei unterschiedlichen Vesikelklassen zusammengesetzt, die sich in ihrer Fusionsgeschwindigkeit unterscheiden: *slowly releasable pool* (SRP) und *readily releasable pool* (RRP) [95, 96].

Eine effektive Freisetzung der Neurotransmitter benötigt eine präzise räumliche Regulation der Lipid-Protein-Interaktionen für die gezielte Positionierung der synaptischen Vesikel, für das Andocken an die Membran, die Vorbereitung und die anschließende Fusion an der aktiven Zone [97-101]. Es ist bekannt, dass Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2)-DAG-vermittelte Signaltransduktion und Lipid-Protein-Interaktionen in den synaptischen Zyklus eingreifen und Schritte wie Anlagerung und Fusion der Vesikel regulieren [100, 101]. Andere Untersuchungen zeigten, dass PIP_2 außerdem in der Lage ist, die Funktion der spannungsabhängigen P/Q-Typ-Calciumkanäle, negativ zu regulieren [102]. Diese sind verantwortlich für den Ca^{2+} -Einstrom in die Präsynapse nach Eintreten eines axonalen Reizes.

In den Prozess der Vesikelfusion sind Vorgänge wie radikale geometrische Umstrukturierung und sequenzielle Verschmelzung zwischen Vesikel und Plasmamembran-Doppelschicht involviert. Die Lokalisation der Lipide und ihre molekulare Geometrie können die Exozytose moderieren. So beeinflussen Lipide mit polarer Kopfgruppe und gesättigten Fettsäureresten, wie

z. B. Glycolipide und LPA, eine positive Krümmung der Membran, während Lipide wie DAG, PIP₂ und PA zu einer negativen Krümmung der Plasmamembran führen [103].

Die Modulierung der Phospholipide über Phospholipasen, Phosphatasen und Kinasen spielt eine wichtige Rolle in der Exozytose allgemein und insbesondere in der Neurotransmitter Exozytose. So wurde gezeigt, dass Phospholipase A, welche PA in LPA umwandelt, Umstrukturierungen der Plasmamembran und vesikulärer Lipide vermittelt und an der Knospung, Anlage- rung sowie der Fusion der synaptischen Vesikel beteiligt ist [104, 105].

Die Lipid-Protein-Wechselwirkungen spielen auch bei der Endozytose synaptischer Vesikel eine bedeutende Rolle. Phospholipide vermitteln Interaktionen mit cytoplasmatischen Protei- nen, welche für die Schritte der Endozytose, wie Keimbildung, voranschreitende Einstülpung der Membran (Invagination), Abschnürung des Vesikels (Fission) und die sogenannte *uncoating* Reaktion, in der die Proteinhülle des Vesikels wieder abgestreift wird, notwendig sind [97, 98, 100, 106].

2 Ziel der Arbeit

Das zentrale Nervensystem ist das vielschichtigste System, das die Evolution hervorgebracht hat. Die Entwicklung dieses Systems unterliegt einer ungeheuren Komplexität und Organisation, woran unzählige intrinsische und extrinsische Faktoren beteiligt sind. Die Identifizierung und Charakterisierung von Molekülen, welche bei der Entwicklung des Nervensystems beteiligt sind, liefern einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis des funktionellen Ablaufs dieses diffizilen Prozesses. PRG1 ist ein neu entdecktes transmembranäres Protein, welches in Vertebraten hoch konserviert und nach einer Schädigung des ZNS hochreguliert ist. Neueste Untersuchungen identifizierten PRG1 als einen Modulator der synaptischen Exozytose, da es in die LPA-Signaltransduktion eingreift. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten deshalb als übergeordnetes Ziel Erkenntnisse über die Rolle von PRG1 und LPA im Gehirn gewonnen werden. Dafür wurden folgende Teilziele verfolgt:

Teilziel 1: PRG1

- Um Hinweise auf mögliche Funktionen von PRG1 zu bekommen, sollte seine Expression, mittels quantitativen Real-Time-PCR, während der Entwicklung des Gehirns der Maus untersucht werden.
- Um detaillierte subzelluläre Lokalisationsanalysen von PRG1 in hippocampalen Neuronen *in vitro* durchführen zu können, sollte eine Aufreinigung eines spezifisch gegen PRG1 gerichteten Antikörpers aus Immuns Serum erfolgen.
- Die immunocytochemischen Studien der zellulären Lokalisation sollten zu unterschiedlichen Differenzierungsstadien des neuronalen Netzes in Kultur mit neuronalen, dendritischen oder axonalen Markern erfolgen.

Teilziel 2: LPA und LPA-Rezeptoren

Vor dem Hintergrund, dass PRG1 als ein Modulator der synaptischen Exozytose in die LPA-Signaltransduktion eingreift, sollte der Einfluss von LPA auf die synaptische Transmission in primären hippocampalen Neuronen untersucht werden.

- Dafür wurden zunächst Expressionsanalysen der LPA-Rezeptoren in neuronalem Gewebe und in primären hippocampalen Neuronen durchgeführt, um die beteiligten Rezeptoren einzugrenzen.

- Die Fusion der synaptischen Vesikel und die Freisetzung der Neurotransmitter sind Prozesse, bei denen eine lokale Calciumerhöhung eine zentrale Rolle spielt. Um die Beteiligung von LPA in diesen Prozessen zu klären sollte intrazelluläres Calcium nach LPA-Stimulus mittels des Calciumindikators Fura-2/AM gemessen werden.
- LPA-induzierte, intrazelluläre Signalkaskaden und eine mögliche Beteiligung der spannungsgesteuerten Calciumkanäle sollten unter Einsatz von pharmakologischen Inhibitoren untersucht werden.
- Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, die Funktion von LPA in der synaptischen Transmission unter Verwendung von lebenden Neuronenkulturen aufzuklären.

3 Materialien und Methoden

3.1 Verwendete Materialien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden von den Firmen Fluka, Merck, Serva, Sigma, Invitrogen, Amersham Biosciences, Pierce, Roth und BioRad in analytischer Qualität bezogen. Abweichungen sind im Text vermerkt.

Bezugsquelle für Zellkultur: Materialien oder Medien wurden von den Firmen BD Biosciences Discovery Labware, Nunc, Sarstedt, Biochrom KG, Invitrogen und PAN bezogen. Enzyme und qRT-PCR-Materialien wurden von den Firmen Fermentas, Stratagene, New England Biolabs und Applied Biosystems verwendet.

3.2 Geräte

Gerät	Hersteller
ABI PRISM TM7500 Fast System Sequence-Detection	Applied Biosystems
BioMate3 Spektrometer	Thermo Scientific
Dounce Homogenisator, Sonoplus GM70	Bandelin Elektronik
Elektronenmikroskop Leo 912 AB Omega	Zeiss
Elektrophorese-System Mini-Protean II	BioRad
EasyCast Mini Gel Model B1A und B2	Owl Separation Systems
Fluoreszenzmikroskop BX50	Olympus
Fluoreszenzmikroskop BX70	Olympus
Fluoreszenzmikroskop BX81	Olympus
HERAcell CO ₂ -Inkubator	Heraeus
Konfokales Laser Scanning Mikroskop TCS SL	Leica
Microtom HM 650 V	Thermo Scientific
PCR-Gerät, PTC-100™	MJ Research
PerfectBlue Semi-Dry Elektrobloetter	Peqlab
Synergy2 Multi-Mode Microplate Reader	BioTek
ULTRA TURRAX T25 basic	IKA-Werke
Ultrazentrifuge, CoulterOptima L-90K	Beckman

Ultramikrotom, Reichert Ultracut S

Leica

US Autoflow Automatic CO₂-Inkubator

NuAire

3.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Primer für die Genotypisierung von LPA1- und LPA2-KO-Mäusen wurden in Arbeiten von [37] (LPA1-KO) und [69] (LPA2-KO) publiziert.

3.4 Konstrukte

Tabelle 2: Zusammenfassung aller verwendeten Konstrukte. Alle Konstrukte waren am N-Terminus mit einem Epitop flankiert.

Konstrukt	Bezeichnung	Vektor	Epitop-,tag“
eGFP-mPRG1	Maus PRG1 „Wildtyp“	PEGFP-C1	GFP
Sytl-pHluorin	pH-sensitives GFP fusioniert mit SynaptophysinI	pFUGW	GFP

3.5 Antikörper

Alle verwendeten primären und sekundären Antikörper sind in Tabelle 3 und Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 3: Zusammenfassung eingesetzter Primärantikörper. EH: eigene Herstellung (anti-PRG1: Juniorprof. Dr. A. Bräuer; anti-LPA2: Dr. J. Aoki); IF: Immunfluoreszenz; IB: Immunblot

Name	Antigen	Spezies (Art)	Hersteller	Konzentration/ Verdünnung
anti-LPA1	LPA1	Kaninchen (polyklonal)	Biozol	2 µg/ml IB
anti-LPA-2	LPA2	Ratte (monoklonal)	EH	1:500 IB; 1:250 IF
anti-739	PRG1	Kaninchen (polyklonal)	EH	1:1000 IB; 1:500 IF
anti-Tuj1	β-III-Tubulin	Maus (monoklonal)	Covance	1:1000 IB; 1:500 IF
anti-Iba1	Iba1	Kaninchen (polyklonal)	Wako	1µg/ml IB
anti-VAMP2	VAMP2	Maus (monoklonal)	SySy	1:5000 IB; 1:1000 IF
anti-α-Tubulin	Tubulin	Maus (monoklonal)	SySy	1:5000 IB
anti-PSD-95	PSD-95	Maus (monoklonal)	Alexis	1:500 IF
anti-VGLUT1	VGLUT1	Meerschweinchen (polyklonal)	Chemicon	1:500 IB; 1:1000 IF
anti-VGAT	VGAT	Meerschweinchen (polyklonal)	SySy	1:1000 IB; 1:500 IF
anti-MAP2	MAP2	Maus (monoklonal)	Sigma	1:1000 IF
anti-Tau1	Tau1	Maus (monoklonal)	Chemicon	1:200 IF
anti-GFAP	GFAP	Maus (monoklonal)	Chemicon	1:2000 IB
anti-β-Aktin	β-Aktin	Maus (monoklonal)	Sigma	1:5000 IB

Tabelle 4: Darstellung aller verwendeten Sekundärantikörper. IF: Immunfluoreszenz; IC: Immunocytochemie; IB: Immunoblot

Name	Antigen	Spezies (Art)	Hersteller	Verdünnung
anti-mouse IgG Alexa Fluor 568	Maus IgG	Ziege	Molecular Probes	1:1000 IF
anti-rat IgG Alexa Fluor 488	Ratte IgG	Ziege	Molecular Probes	1:1000 IF
anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488	Kaninchen IgG	Ziege	Molecular Probes	1:1000 IF
Cy TM 3-conjugated AffiniPure Goat anti-Guinea Pig IgG	Meerschweinchen IgG	Ziege	Dianova	1:1000 IF
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat anti-Guinea Pig IgG	Meerschweinchen IgG	Ziege	Dianova	1:5000 IB
Nanogold [®] -anti rat IgG	Ratte IgG	Ziege	Nanoprobes	1:100 IC
Nanogold [®] -anti rabbit IgG	Kaninchen IgG	Ziege	Nanoprobes	1:100 IC
anti-mouse-IgG-horseraddish peroxidase linked whole antibody	Maus IgG	Schaf	Amersham Biosciences	1:5000 IB
anti-rabbit-IgG-horseraddish peroxidase linked whole antibody	Kaninchen IgG	Esel	Amersham Biosciences	1:5000 IB
anti-rat-IgG-horseraddish peroxidase linked whole antibody	Ratte IgG	Ziege	Amersham Biosciences	1:5000 IB

3.6 Real-Time-PCR-Assays

Tabelle 5: Verwendete quantitative Real-Time-PCR-Assays. LPA-R: Lysophosphatidsäure Rezeptor, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, eIF1A: Translationsinitiation Faktor 1a, Pgk1: Phosphoglycerat Kinase 1, HPRT: Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase.

Genbezeichnung	Assay ID	Exonübergang	Amplifikationslänge (Basenpaare)
LPA1-R	Mm00439145_m1	2-3	68
LPA2-R	Mm00469562_m1	2-3	116
LPA3-R	Mm01312593_m1	1-2	158
LPA4-R	Mm01312593_m1	2-3	76
LPA5-R	Mm01190818_m1	1-2	60
PRG1	Mm00724102_m1	2-3	71
Referenzgene für Normalisierung		Assay ID	
GAPDH		4352932E	
eIF1A		Mm00456651_m1	
Pgk1		Mm00435617_m1	
HPRT Primer und Sonde wurden selbst ausgewählt und von Firma Metabion hergestellt		Primer sense: 5'-ATCATTATGCCGAGGATTTGGAA-3' antisense: 5'-TTGAGCACACAGAGGGCCA-3' Sonde: 5'-TGGACAGGACTGAAAGACTTGCTCGAGATG-3'	

Für die Effizienzbestimmung der qRT-PCR-Primer wurde für alle Assays Hippocampus-cDNA aus der Maus verwendet. Eine Ausnahme bildeten die Assays für den LPA3- und den LPA5-Rezeptor. Da festgestellt wurde, dass diese beiden Rezeptoren nicht im Gehirn exprimiert wurden, wurde hier Milz-cDNA aus der Maus eingesetzt.

3.7 Bakterienstämme und Zelllinien

Tabelle 6: Übersicht über verwendete Bakterienstämme und Zelllinien

Bakterienstamm	Genotyp	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> XL1 Blue	<i>endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r_K⁻ m_K⁺)</i>	Stratagene
<i>E. coli</i> XL 10Gold	<i>endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac The Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsd SMR-mrr)173 tetR F'[proAB lacIqZΔM15 Tn10(TetR Amy CmR)]</i>	Invitrogen
Zelllinie	Bezeichnung	Bezugsquelle
HEK293	humane embryonale Nierenzelllinie	DMSZ
N1E-115	Maus-Neuroblastomzelllinie	ATCC
NSC-34	neuronale Stammzelllinie	Institut de Neurobiologie de la Méditerranée, Marseille, Frankreich
mES D3	embryonale Stammzellen der Wildtypzelllinie D3	Federal Institute for Risk Assessment, Berlin, Deutschland

3.8 Versuchstiere

Zur Isolierung von hippocampalen Neuronen wurden terminiert verpaarte C57/BL6-, für alle Kontrollversuche zur LPA1-KO und LPA2-KO BalbC-Mäuse verwendet, die aus der Zucht der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) in Berlin bezogen wurden. LPA1-KO und LPA2-KO-Tiere wurden von J.J. Contos und Kollegen [37, 69] und die PRG1-KO-Maus von T. Trimbuch und Kollegen generiert [77] und ebenfalls in der FEM gezüchtet.

3.9 Verwendete Puffer und Medien

3.9.1 Zell-Wachstumsmedium

Zelllinien:	DMEM, 10 % FCS, 0,5 mM L-Glutamin, 1 % Penicilin/Streptomycin
2x Einfriermedium	20 % (v/v) DMSO, 20 % (v/v) Glycerol, 60 % (v/v) FCS, steril filtriert
Primäre Neurone:	Plating-Medium 3 ml 20 % Glucose, 10 ml Pferdeserum (PAN) mit MEM (Gibco) Medium auf 100 ml aufgefüllt, steril filtriert

Wachstumsmedium

Neurobasal A (PAN), 2 % B27, 0,5 mM L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin

Bakterien-Wachstumsmedien und -platten

DYT-Medium 16 g Bacto-Trypton, 10 g Hefeextrakt, mit 5 g NaCl aufgefüllt auf 1 l mit H₂O, pH 7,4, autoklaviert

DYT-Agar 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 20 g Agar aufgefüllt auf 1 l mit H₂O, pH 7,4, autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf ca. 40-50 °C erfolgte Zugabe von Antibiotika

Puffer zur Herstellung hitzekompetenter Bakterien

TfB I-Puffer: 30 mM Kaliumacetat, 50 mM MnCl₂, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 15 % Glycerin, pH 5,8 (mit 0,2 N Hac eingestellt), sterilfiltriert

TfB II-Puffer: 10 mM Na-MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15 % Glycerin, pH 7,0, anschließend steril filtriert

3.9.2 Agarosegel-Elektrophorese

10x TBE-Puffer: 108 g Tris, 55 g Borsäure, 40 ml EDTA 0,5 M pH 8,0, aufgefüllt auf 1 l mit dH₂O

10x TBE-Guanosin Puffer: 10x TBE-Puffer mit 2,8 g Guanosin

10x DNA-Ladepuffer: 50 g Sucrose, 0,25 g Bromphenolblau aufgefüllt auf 100 ml mit 1x TBE-Puffer

3.9.3 Plasmidextraktion

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl Puffer pH 7,2, 10 mM EDTA

Minipreplösung E1: 10 mM EDTA pH 8,0, 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 µg/ml RNaseA, 100 µg/ml Lysozym

Minipreplösung E2: 1 % (w/v) SDS, 0,2 M NaOH

Minipreplösung E3: 3 M Kaliumacetat, 11,5 % Essigsäure

3.9.4 Proteinisolierung

Proteinisolierungspuffer aus HEK-Zellen und Gewebehomogenat 20 mM Tris, pH 7,5, 0,25 M Sucrose, 1 mM EGTA, 5 mM EDTA, 25x Proteinase Inhibitor Cocktail (Sigma)

Proteinisolierungspuffer für LPA-Rezeptoren: 50 mM Tris HCl pH 7,4, 300 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 1,5 mM MgCl₂, 10 % Glycerol, 1 mM CaCl₂, 10 mM Jodacetamid, 25x Proteinase Inhibitor Cocktail (Sigma)

3.9.5 Immunblot-Lösungen

3x Probenpuffer: 60 mM Tris, 10 % (w/v) Saccharose, 10 % (w/v) SDS, 5 mg Bromphenolblau, aufgefüllt auf 10 ml H₂O

Sammelgel 3,75 %: 1,5 ml Tris I pH 6,8, 750 µl Rotiphorese® Gel A, 300 µl Rotiphorese® Gel B, 3,45 ml dH₂O, 7,8 µl TEMED 60 µl 10 % Ammoniumpersulfat

Trenngel 12 %: 4 ml Tris II (pH 8,8), 6,4 ml Rotiphorese® Gel A, 2,56 ml Rotiphorese® Gel B, 3,04 ml dH₂O, 20 µl TEMED, 160 µl 10 % Ammoniumpersulfat

10x SDS-PAGE-Laufpuffer: 0,25 M Tris, 1,92 M Glycin, 1 % (w/v) SDS

Semi-dry Transfer-Puffer: 192 mM Glycin, 25 mM Tris, 20 % v/v Methanol

10x Ponceau-Rot: 2 ml Ponceau S, 0,3 % (v/v) Trichloressigsäure auf 1 l dH₂O aufgefüllt

10x PBS: 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,5 g Na₂HPO₄·2H₂O, 2,4 g KH₂PO₄ aufgefüllt auf 1 l dH₂O, pH 7,4

3.9.6 Sonstige Puffer und Lösungen

4 % PFA: 4 g Paraformaldehyd in 50 ml H₂O und 1 ml 1 M NaOH bei 60°C aufgelöst, mit 10 ml 10x PBS versetzt, pH 7,4, auf 100 ml H₂O aufgefüllt, filtriert, Zugabe von 15 % Sucrose

LPA-Lösepuffer: 1 ml 0,5 M HEPES, 1,38 ml NaCl, 27 µl 1 M KCl, 10 µl 1 M CaCl₂, 20 µl 0,5 M MgCl₂, 1 % BSA (*fatty acid free*, Sigma), auf 10 ml mit dH₂O aufgefüllt

3.10 Allgemeine molekularbiologische Methoden

3.10.1 Herstellung hitzekompetenter Zellen

Um die Zellen für die Aufnahme von Fremd-DNA kompetent zu machen, wurden 1 l DYT-Medium mit 5 ml einer dichtgewachsenen Bakterienkultur beimpft und so lange im Schüttelkolben bei 37 °C kultiviert, bis eine OD₆₀₀ von 0,5-0,6 erreicht wurde. Anschließend wurden die Bakterien in Eiswasser abgekühlt und in 4 vorgekühlte Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 5000x g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde jedes Pellet in 75 ml TfB I-Puffer resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation; die Pellets wurden in 10 ml TfB II-Puffer resuspendiert und in 50 ml-Röhrchen überführt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (15 min, 3000x g, 4 °C) wurden die Pellets in 2 ml TfB II-Puffer aufgenommen, in 400 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

3.10.2 Hitzetransformation in *E. coli*-Zellen

Hitzekompetente *E. coli* XL1 Blue- oder *E. coli* XL10 Gold-Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 0,5-1 µg Plasmid-DNA vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42 °C. Der Ansatz wurde sofort zurück auf Eis gestellt und mit 400 µl DYT-Medium versetzt. Die transformierten Zellen wurden 1 h unter Schütteln bei 37 °C inkubiert und anschließend in einen Kolben mit 250 ml DYT-Medium, versetzt mit entsprechenden Antibiotika, überführt. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C unter Schütteln kultiviert.

3.10.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Der PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen: Template-DNA (1-10 ng Plasmid-DNA bzw. 100-200 ng genomische DNA), je 1 µl sense- und antisense Primer (100 pM), 2 µl dNTPs (2,5 mM), 1 µl 10x Polymerase Puffer, 1-5 U Polymerase und ddH₂O. Das Gesamtvolumen betrug 25 µl. Für die PCR-Fragmente, die für die Klonierung amplifiziert wurden, wurde die HotStart und Proof-Reading Polymerase HerculaseTM der Firma Stratagene, für die Genotypisierungen die GoTaqTM-Polymerase der Firma Promega verwendet.

3.10.4 Minipräparation von Plasmid-DNA nach Birnboim/Doly

Eine *E.coli*-Kolonie wurde in 5 ml DYT-Medium, versetzt mit entsprechenden Antibiotika, ca. 16 h bei 37 °C unter Schütteln gezüchtet. Am nächsten Tag wurde die Übernachtskultur bei maximaler Geschwindigkeit einer Tischzentrifuge 1 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und verworfen. Das Sediment wurde in 200 µl Lösung E1 resuspendiert. Danach erfolgte die Zugabe von 200 µl Lösung E2-, ein 5-maliges Überkopfschwenken und eine ca. 3-minütige Inkubation bei RT. Nach Zugabe von 200 µl Lösung E3, folgte eine erneute Zentrifugation für 20 min. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das klare Lysoat mit 900 µl Isopropanol versetzt. Anschließend wurde 20 min zentrifugiert und das Präzipitat mit 1 ml 70 % EtOH gewaschen. Das Pellet wurde ca. 10 min an der Luft getrocknet und das DNA-Pellet in 30 µl H₂O gelöst.

3.10.5 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Aus einer Übernachtskultur wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des Nucleo Bond[®]PC100 Maxiprep Kits (Macherey-Nagel) nach Anweisung des Herstellers isoliert. Die DNA wurde in 100 µl TE-Puffer pH 8,0 aufgenommen, die Konzentration photometrisch bestimmt und auf eine Endkonzentration von 1 µg/µl durch Verdünnung mit TE-Puffer eingestellt.

3.10.6 Isolierung von genomischer DNA und Genotypisierung

Um die genomische DNA aus Schwanzbiopsien der KO-Mäuse zu isolieren, wurde das Invisorb[®] Spin Tissue Mini Kit der Firma Invitex verwendet. Die Durchführung erfolgte wie vom Hersteller angegeben. 1 µl der gewonnenen DNA wurde für die anschließende Genotypisierungs-PCR mit den spezifischen Primern (siehe 3.3) eingesetzt. Im anschließenden Agarosegel zeigte das PCR-Produkt, amplifiziert mit LPA1-KO-Primern, eine Bande für Wildtyp-Tiere bei 348 und für LPA1-KO-Tiere bei 227 bp. Das PCR-Produkt mit den LPA2-KO-Primern zeigte eine Wildtypbande bei 249 und eine LPA2-KO-Bande bei 207 bp.

3.10.7 Restriktionsverdau

Für den Verdau wurde 1 µg Plasmid-DNA mit 1x U je Restriktionsenzym behandelt. Bedingungen und Additive wurden gemäß Herstellerangaben gewählt. Die Inkubation erfolgte 30 bis 50 min bei 37 °C. Die DNA-Fragmente wurden anschließend mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert.

3.10.8 Agarosegel-Elektrophorese

Bei allen Versuchen wurde eine horizontale Gel-Elektrophorese angewendet. Zur Herstellung eines 1 %igen Gels wurden 1 g Agarose in 100 ml 1x TBE-Puffer aufgekocht, bis alle Bestandteile vollständig gelöst waren. Um die DNA im Gel sichtbar zu machen, wurden dem noch flüssigen Gel 0,3 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Die aufzutrennenden Proben wurden mit 10x DNA-Ladepuffer versetzt. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei 80 V. Die Banden im Gel wurden mittels UV-Strahlung sichtbar gemacht und digital aufgezeichnet.

3.10.9 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Proben wurden durch die Firma Eurofins MWG Operon sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe einer Datenbank unter <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, mit der Funktion Nucleotide-Nucleotide BLAST, verglichen und der DNASIS[®] MAX-Software (Hitachi Software Engineering) ausgewertet.

3.11 Zellkultur

3.11.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden ca. 80 % konfluente Zellen mit 1x PBS gewaschen und vom Boden der Kulturflaschen abgeschabt. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 900x g pelletiert. Das Pellet einer T 75 (75 cm²) Flasche wurde in 1,5 ml Medium resuspendiert und davon jeweils 0,5 ml in ein Einfriereröhrchen überführt und mit 0,5 ml 2x Einfriermedium versetzt. Danach wurde die Zellsuspension auf -80 °C abgekühlt und im Anschluss daran in flüssigem Stickstoff gelagert. Um die

eingefrorenen Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden sie bei 37 °C rasch aufgetaut, 1 ml Zellkulturmedium zugegeben, gut resuspendiert und schonend bei 80x g zentrifugiert und das DMSO durch Zentrifugation (4 min) entfernt. Das Pellet wurde im frischen Medium resuspendiert und in eine T 25 (Fläche = 25 cm²) Flasche mit 10 ml Medium überführt.

3.11.2 Kultur und Passage

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen der Größe T 25, T 75 und T 175 (175 cm²) in einer 5 %iger CO₂-Atmosphäre bei 37 °C kultiviert. Sie wurden jeweils 2-3 Mal pro Woche passagiert und je nach Zellart und Zelldichte ausgedünnt. Dazu wurden die Zellen mit einem Zellschaber in 3-5 ml Medium abgelöst und anschließend 5 min bei 900x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Medium resuspendiert und auf das gewünschte Volumen aufgefüllt. Die Zellen wurden auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

3.11.3 Beschichtung mit Poly-L-Lysin

Für die Kultivierung von primären Neuronen und HEK293-Zellen wurden die Petrischalen bzw. Well-Platten entsprechend vorbereitet. In die Well-Platten wurden zunächst Deckgläschen vorgelegt. Danach wurde für mindestens 4 h oder über Nacht bei 37 °C mit Poly-L-Lysin (10 mg/ml Stocklösung gelöst in ddH₂O Wasser) inkubiert. Kurz vor Zellaussaat wurden die Deckplättchen bzw. Petrischalen 2-3x mit ddH₂O (oder dPBS) gewaschen. Danach wurden die Zellen in gewünschter Dichte ausplattiert.

3.11.4 Primäre hippocampale Zellkultur

Für die Präparation primärer neuronaler Kulturen wurden Mausembryonen im Embryonalstadium 18-19 verwendet. Der Unterleib des Muttertiers wurde geöffnet und die Uteri entnommen. Nach dem Dekapitieren der Embryonen wurde das Gehirn vorsichtig entnommen. Die Meningen wurden vorsichtig entfernt, die Hippocampi herauspräpariert und in HBSS gesammelt. Anschließend wurden die Hippocampi 2 Mal gewaschen und zu einem Gesamtvolumen von 5 ml mit HBSS aufgefüllt. Zum Gewebe wurde 100-500 µl Trypsin (2,5 % Gibco) zugegeben und bei 37 °C inkubiert. Nach 15-20 min wurde die Verdauung abgenommen und die Aktivität von Trypsin durch Zugabe von 3 ml Plating-Medium gestoppt. Zur Suspension wurde 2 µl DNase zugefügt und die

Zellen sehr langsam mit einer feuerpolierten Pasteurpipette trituiert. Nach dem Absetzen nichtverdauter Bestandteile wurde der Überstand in ein neues Röhrchen überführt und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden auf mit Poly-L-Lysin (verdünnt in Boratpuffer) beschichteten Platten ausgesät. Die Zelldichte war dabei vom jeweiligen Experiment abhängig. Nach einer Inkubation von 3 h im Brutschrank wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und in frischem Wachstumsmedium aufgenommen.

3.11.5 *Transfektion*

Transfektion von primären Neuronen mittels Effectene

Die Transfektion von primären Neuronen erfolgte mittels Effectene-Transfektions-Reagenz nach Angaben der Firma Qiagen. Zuerst wurden 150 μl Puffer EC in einem Reaktionsgefäß vorgelegt. Es wurden 1-2 μg DNA und 10 μl Enhancer zugegeben und gut gemischt. Der Ansatz wurde ca. 5 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 12-18 μl Effectene-Reagenz. Der Transfektionsansatz wurde nun für weitere 10 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium von den Zellen durch 1 ml frisches Medium ersetzt. Der Transfektionsansatz wurde vorsichtig auf die Zellen gegeben. Nach 1 h wurden die Zellen gewaschen und im frischen Medium wieder aufgenommen. Nach weiteren 24 bis 48 h konnten die Zellen zur weiteren Analyse verwendet werden.

Transfektion von HEK293-Zellen mittels Calciumphosphat

Zur Proteinisolierung wurden HEK293-Zellen vom Flaschenboden abgeschabt, pelletiert, resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden 3×10^4 Zellen pro cm^2 beschichteter Zellkulturschale bzw. Well-Platten ausplattiert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen konnten transfiziert werden. Der Transfektionsansatz bestand aus einem Gemisch von 0,5 μg DNA, 45 μl dH_2O , 4 μl Calciumchlorid (2,5 M) und 45 μl HEPES Puffer (pH 7,1-7,2). Die Volumina bzw. DNA-Konzentration beziehen sich auf eine Fläche von 10 cm^2 . Der Ansatz wurde gemischt und nach Ausbildung der Präzipitate tropfenweise in die Zellkulturschale pipettiert. Nach 1-2 Tagen wurden die Zellen lysiert und die Proteine isoliert.

3.11.6 *Behandlung mit LPA*

Die LPA wurde in LPA-Lösepuffer gelöst und als 2,6 mM Aliquots bei -20 °C eingefroren. Die Stammlösung wurde kurz vor der Behandlung im Zellkulturmedium oder in einem geeigneten Puffer auf die benötigte Konzentration verdünnt. Das alte Medium wurde entfernt und die LPA-Lösung auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde 10 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Bei Calciumexperimenten erfolgten eine direkte Applikation und eine anschließende Messung ohne Inkubationszeit.

3.12 Immunologische Färbungen

3.12.1 *Immuncytochemie*

Für immuncytochemische Untersuchungen wurden die Neurone in einer Dichte von $80-100 \times 10^3$ in 12 Well-Platten ausplattiert. Nachdem die Zellen ein gewünschtes Wachstumsstadium erreicht hatten, wurden sie mit eiskalter PFA-Sucrose-Lösung 20 min bei RT fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen 3 Mal für 10 min mit 1x PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Permeabilisierung der Plasmamembran für 3 min bei 4 °C mit 0,1 % (v/v) Triton X-100 mit Zusatz von 0,1 % (w/v) Natriumcitrat in 1x PBS. Nach 3maligem Waschen mit 1x PBS folgte eine Blockierung mit 10 % (v/v) FCS-Lösung (in 1x PBS) 1 h bei RT. Anschließend wurde mit einem primären Antikörper (verdünnt in 5 % FCS-Lösung) für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgten 3 Waschschrte und die anschließende Zugabe des sekundären Antikörpers (verdünnt in 5 % FCS-Lösung) für 1 h bei RT. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit dem sekundären Antikörper behandelt wurden. Nach Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurden die Zellen erneut gewaschen und anschließend auf einem Objektträger luftblasenfrei mittels Immu-Mount (Thermo Scientific) eingedeckt.

3.12.2 *Perfusion von Mäusen*

Um das Blutsystem der Mäuse auszuspülen, wurden die Tiere mit einer isotonischen Lösung perfundiert und anschließend mit einem Fixierungsmittel behandelt. Zuerst enthielten die Tiere entsprechend ihrem Gewicht eine Narkoselösung (0,5-1 ml/20-25 g), ein Gemisch aus 10 ml

Ketamin (CuraMED Pharma), 4 ml Rompun (Bayer Health Care) und 36 ml 0,9 % NaCl. Sobald sich die Mäuse in tiefer Narkose befanden, wurde die Bauchdecke geöffnet und durch ein seitliches Einschneiden der Rippen und das Hochklappen des Brustkorbes ein Zugang zum Herzen ermöglicht. Eine Kanüle wurde in den linken Ventrikel des Herzens gestochen, der rechte Vorhof geöffnet und eine 0,9 %ige NaCl-Lösung über die Kanüle perfundiert. Nachdem die Leber entfärbt war, erfolgte eine Fixierung des Gewebes mit einer 4 %igen PFA-Lösung. Anschließend wurde der Schädel geöffnet, das Gehirn herauspräpariert und in einem Röhrchen über Nacht mit 4 % PFA nachfixiert.

3.12.3 Vibratomschnitte

Das nachfixierte Gehirn wurde mehrmals mit 0,1 M PB gewaschen und in 4 %iger lauwarmer Agarose eingebettet. Die auspolymerisierte Agarose wurde in einem Block herausgeschnitten und das Gehirn mittels eines Vibratoms (Microm HM 650 V) zu 50 µm dicken Schnitten verarbeitet. Die Schnitte wurden in 0,1 M PB gesammelt und für immunhistochemische Analysen verwendet.

3.12.4 Immunhistochemische Färbungen und DAB-Entwicklung

Die angefertigten Schnitte wurden zunächst in einer Blockinglösung aus 10 % FCS, 0,1 % Glycin, 0,1 % Lysin, 0,1 % Triton X-100 und 0,02 % Thimerosal permeabilisiert und geblockt. Nach 1 h Inkubationszeit bei RT wurden die Schnitte mit primärem Antikörper verdünnt in Blockinglösung über Nacht bei 4 °C auf den Schnitten inkubiert. Am nächsten Tag wurde 3 Mal mit 0,1 M PB gewaschen. Es folgten 2 h Inkubation bei RT mit einem sekundären, Biotin-gekoppelten Antikörper, ebenfalls verdünnt in Blockinglösung (ohne Triton X-100). Anschließend wurden die Schnitte 3 Mal mit 0,1 M PB gewaschen und in ABC-Lösung aus dem DAB-Elite Kit der Firma (VECTASTAIN[®], Vector) 30 min bei RT inkubiert. Es folgte eine Inkubation mit filtrierter DAB-Lösung für einige min (17,5 mg DAB in 25 ml 0,1 M PB gelöst und in Aliquots bei -4 °C gelagert). Zur Verstärkung des DAB-Signals wurden 100 µl 1 % CoCl₂·6H₂O, 80 µl 1 % H₈N₂NiO₈S₂X₆H₂O auf 10 ml DAB-Lösung pipettiert. Nach erneutem Waschen wurden die Schnitte vorsichtig auf Objektträger aufgezogen und mittels Immu-Mount eingedeckelt. Die Aufnahmen der Präparate erfolgten am Elektronenmikroskop Leo 912 AB Omega, der Firma Zeiss.

3.13 Mikroskopische Aufnahmen von fixierten Präparaten

3.13.1 Konfokalmikroskopische Untersuchung

Die Untersuchung der fixierten Präparate erfolgte mit einem Leica TCS SL Laser Scanning Confocal Mikroskop mit 40X HCX PL APO, 1,25 NA oder 63X HCX PL APO, 1,4 NA Öl-Immersionsobjektiven. Die Aufnahmen wurden über eine integrierte Kamera gemacht und mittels einer LCS Lite-Software digitalisiert. Es wurden ein Argon-Ionen-Laser für Aufnahmen bei 488 nm und ein Helium-Neon-Laser für 543 nm eingesetzt. Aufnahmen wurden durch die Überlagerung mehrerer konfokaler Aufnahmen sogenannte „z-stacks“ angefertigt. Die Hintergrundkorrektur sowie die Überlagerung unterschiedlicher Farbkanäle erfolgten gegebenenfalls mit der Software des Konfokalmikroskops oder mit dem Programm Corel Draw.

3.13.2 Epon-Einbettung von Vibratonschnitten für Elektronenmikroskopie

Die Vibratonschnitte wurden zuerst in einer 1 %igen (v/v) Osmiumtetroxid-Lösung 10 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgten 3 Waschschrte für 10 min mit 0,1 M PB-Lösung. Mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte entwässert: Schritt 1: 30 % (v/v) Ethanol 5-10 min, Schritt 2: 50 % (v/v) Ethanol 10 min. Für eine Kontrastierung der Schnitte erfolgte eine Inkubation bei 4° C über Nacht in 75 % (v/v) Ethanol + 0,5 (v/v) Uranylacetat und 0,5 % (v/v) Phosphorwolframsäure, im Dunkeln. Am nächsten Tag folgte eine Entwässerung in 96 %igen (v/v) Ethanol für 10 min und in 100 %igen (v/v) Ethanol für 10 min. Anschließend wurden die Schnitte in 100 %igen (v/v) Ethanol und Kupfersulfat 2 Mal für 5 min und in Propylenoxid 2 Mal für 10 min inkubiert. Die Einbettung in Eponharz erfolgte in 3 Schritten: Schritt 1: 1:3 Eponharz und Propylenoxid für 30 min; Schritt 2: – 1+1 Eponharz und Propylenoxid für 30 min und Schritt 3: 3:1 Eponharz und Propylenoxid über Nacht bei 4° C in gut verschlossenen Gläschen. Am nächsten Tag wurden die Schnitte auf Objektträgern platziert und mit einem Deckgläschen verschlossen. Für das Aushärten des Eponharzes wurden die Präparate bei 60° C über Nacht inkubiert. Im Folgenden wurden die Schnitte vom Deckglas und Objektträger gelöst und für die weiteren Anwendungen am Ultramikrotom vorbereitet. Am Ultramikrotom wurden Präparate in 70 nm Schnittstärke angefertigt.

3.14 Proteinbiochemische Methoden

3.14.1 Affinitätsaufreinigung des PRG1-Antikörpers

Bevor der PRG1-Antikörper aus dem Serum des immunisierten Kaninchens spezifisch isoliert werden konnte, sollten zuerst die Proteine mittels einer Ammoniumsulfatfällung präzipitiert werden. Dafür wurden 20 ml Serum in einem 50 ml-Röhrchen 1 min bei 15.000x g pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 1x PBS auf ein Gesamtvolumen von 30 ml gebracht. Die Immunglobuline wurden durch langsame Zugabe einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung (Endkonzentration 1,64 M) und gleichzeitiges Rühren gefällt. Das Proteingemisch wurde für eine weitere Stunde gerührt und anschließend 20 min bei 10.000x g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat in 40 %igen (v/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung resuspendiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 10.000x g für 20 min. Das Pellet wurde in 1x PBS gelöst und über Nacht dialysiert. Die Proteinsuspension wurde in einen Dialyseschlauch gefüllt und 2 h unter Rühren gegen 1x PBS dialysiert. Es folgte eine Dialyse über Nacht bei 4 °C und Rühren in frischem PBS. Am nächsten Tag wurde erneut 2 h unter Rühren bei RT gegen frischen PBS dialysiert. Währenddessen erfolgte die Kopplung des Liganden an die HiTrap™ NHS activated HP 1 ml-Säule der Firma GE Healthcare. 2 mg Ligand wurden im 1 ml Kopplungspuffer gelöst. Die Kopplung des Liganden an die Säulenmatrix und die Aufreinigung des Antikörpers über die Säulen erfolgte nach Angaben des Herstellers. Nach abschließender Elution wurde der Durchlauf gesammelt. Dazu wurden zunächst 0,3 ml 1 M Tris/Cl, pH 7,4 im Röhrchen vorgelegt. Der eluierte Antikörper wurde mit 0,02 % Thimerosal versetzt und über Nacht bei 4 °C und Rühren gegen 1x PBS dialysiert. Der aufgereinigte Antikörper wurde aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt.

3.14.2 Isolierung von Fusionsproteinen

Für die Isolierung von überexprimierten Proteinen wurden 2×10^5 HEK293-Zellen/Well in die 6-Well-Platten ausgesät und am nächsten Tag transfiziert. Nach 36 h wurde die Inkubation gestoppt. Dafür wurde das Medium entnommen und die Zellen 1 Mal mit eiskalten PBS gewaschen. Die Zellen wurden im Lysispuffer vom Boden der Platten abgeschabt und mittels eines Ultraschallstabes (Bandelin electronic, UW70, 3x 3 sek Impuls) aufgeschlossen. Für die Isolierung von LPA-Rezeptoren wurde ein entsprechender Jodacetamid-haltiger Puffer verwendet, der eine Alkylierung der SH-Gruppen verhindern sollte, die wiederum eine Oxidation der SH-Gruppen und somit eine

uneinheitliche Aggregatbildung zur Folge hätte. Anstelle einer Ultraschallbehandlung wurde die Zellsuspension 1 h auf Eis inkubiert. Die Zellbruchstücke wurden durch anschließende Zentrifugation bei 4 °C und 10.000x g entfernt und der Überstand im Western Blot analysiert.

3.14.3 Proteinisolierung aus Mausgewebe

Das Mausgewebe wurde je nach Größe in 1-3 ml Proteinlysispuffer in einem 15 ml-Röhrchen mittels eines Homogenisators (Ultra-TURRAX[®], T25 basic, IKA Werke) homogenisiert. Durch eine Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 2.500x g wurden nicht aufgelöste Gewebebestandteile pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Anschließend wurde eine Bestimmung der Proteinkonzentration durchgeführt. Die Proben wurden bei -80 °C aufbewahrt. Die Behandlung von LPA-Rezeptor-Proben erfolgte wie oben beschrieben.

3.14.4 Affinitätsaufreinigung der Fusionsproteine über μ Macs-Säulen

Für die Aufreinigung von Fusionsproteinen über μ Macs-Säulen (Miltenyi Biotec) wurden die HEK293-Zellen mit Calciumphosphat in Petrischalen (63,6 cm²) transfiziert. Nach 24 h wurde das Medium durch Waschen der Zellen mit eiskaltem PBS entfernt. Die Zellen wurden in 1 ml Lysis-Puffer abgeschabt und in 1,5 ml-Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde für 1 h auf Eis belassen und dann 10 min bei 4 °C und 10.000x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und über μ MACS-Säulen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert und als Kontrolle für die Western Blot-Analysen eingesetzt.

3.14.5 Präparation der Synaptosomenfraktionen

Für die Synaptosomenfraktionierung wurden primäre Neurone in 6-Well-Platten (5x10⁵ je Well) ausplattiert und 14 Tage kultiviert. Für jede Präparation wurden 3 Wells einer LPA-Behandlung unterzogen. 3 Wells blieben unbehandelt und dienten als Kontrolle. Die LPA-Wirkung wurde durch Abkühlen auf Eis gestoppt. Die Zellen wurden in 1 ml eiskaltem PBS vom Boden abgeschabt und anschließend pelletiert. Das Pellet wurde in 1x PBS resuspendiert und in 9-fachem Volumen dH₂O, versetzt mit Protease-Inhibitoren, lysiert. Die Suspension wurde durch Aufnahme in eine 23G (9x) und eine 27G (6x) Kanüle homogenisiert. Nicht gelöste Zellbruchstücke wurde

durch eine Zentrifugation bei 800x g 10 min entfernt. Der Überstand wurde entnommen, in Ultrazentrifugationsröhrchen für einen TLA 100.4 Rotor überführt und bei 220.000x g 30 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 30-50 µl 1x PBS resuspendiert, die Konzentration bestimmt und mittels Western Blot analysiert. Insgesamt wurden Zellen von 3 unterschiedlichen Präparationstagen für die Untersuchung verwendet (n=3).

3.14.6 Quantifizierung von Proteinkonzentrationen

Um die Proteinkonzentration in einer Probe zu bestimmen, wurde das Pierce[®] BCA Protein Assay Kit der Firma Thermo Scientific eingesetzt. Die Durchführung der Methode erfolgte nach Angaben des Herstellers. Für die Messung wurde die Proteinlösung 1:10 – 1:1000 vorverdünnt. Die Inkubation erfolgte in 96-Well-Mikrotiterplatten für 30 min bei 37 °C. Anschließend wurde die Konzentration photometrisch bei einer Absorbtion von 562 nm gemessen.

3.15 Immunblot

3.15.1 SDS-PAGE

Für die SDS-PAGE wurde ein 7,5 %iges bzw. 12%iges Polyacrylamid-Trenngel mit einem 3,75 %igen Sammelgel verwendet. Die Elektrophoresekammer wurde mit 1x SDS-PAGE Laufpuffer befüllt. Zu den Proteinproben wurde 3x Probenpuffer zugegeben. Eine Ausnahme bildeten hier die Proben, die über µMACS-Säulen aufgereinigt wurden, da der Elutionspuffer bereits SDS und Bromphenolblau enthielt. Es wurde jeweils 1 µl β-Mercaptoethanol zugegeben und 5 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurde 1 µl β-Mercaptoethanol zugegeben und die Proben auf das Gel aufgetragen. Die Proben für die Analyse der LPA-Rezeptoren wurden nicht denaturiert, um eine Aggregation der Proteine zu vermeiden. Das Einlaufen der Proben erfolgte bei 80 V. Sobald die Proben das Trenngel erreicht hatten, wurde die Spannung auf 110 V erhöht.

3.15.2 Western Blot

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurden pro SDS-Gel 2 Filterpapiere, eine Nitrozellulosemembran und das Gel

mit den aufgetrennten Proteinen für 5 min in Blotpuffer getränkt. Anschließend wurden auf die Anode des Gerätes ein Filterpapier, die Membran, das SDS-Gel und ein weiteres Filterpapier gelegt. Nachdem Luftblasen und überschüssige Flüssigkeit entfernt wurden, erfolgte die Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran bei 16 Volt für 45 min. Um die Proteine zur Kontrolle des Blots vorübergehend auf der Membran sichtbar zu machen, wurde diese mit Ponceau-Rot gefärbt, welches anschließend durch Waschen mit 1x PBS wieder entfernt wurde.

3.15.3 Immundetektion der transferierten Proteine

Nach vollständiger Entfernung von Ponceau-Rot wurde der Blot bei RT mindestens 1 h in 10 % (w/v) Magermilch (in 1x PBS) geblockt. Im Anschluss wurde der primäre Antikörper in der entsprechenden Verdünnung in 2 ml 1x PBS zum Blot gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Blot 3x 10 min mit 1x PBS gewaschen und anschließend 2 h (oder über Nacht, 4 °C) mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper in PBS bei RT inkubiert. Zum Schluss wurde der Blot erneut 3x 10 min mit 1x PBS gewaschen.

Zum Nachweis des auf dem Blot gebundenen Antikörpers wurde die Membran für 1 min mit einer Mischung aus ECL-Reagenz 1 und 2 (im Verhältnis 1:1) inkubiert und danach zwischen 2 Folien gelegt. Die entstandene Chemilumineszenz wurde durch Auflegen und anschließende Entwicklung eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

3.16 Quantitative Expressionsanalysen

3.16.1 Isolierung von total-RNA aus Zellen und Gewebe

Die Isolierung der total-RNA aus den Zellen und dem Gewebe erfolgte mittels TRIZOL[®]-Reagenz laut Herstellerangaben. Für die Isolierung der total-RNA aus primären Neuronen wurden diese zuerst in einer Dichte von 3×10^4 Zellen/cm² ausplattiert und dann sieben Tage kultiviert. Zum Zellwachstumsmedium wurde 1 µM Cytosin-Arabinosid gegeben, um das Wachstum von Microglia zu vermeiden. Für 5×10^5 bis 10×10^6 Zellen wurde 1 ml des TRIZOL[®]-Reagenz eingesetzt. Die Zellen wurden nach Zugabe des Reagenzes vom Boden der Petrischalen mit einem Zellschaber abgelöst. Das Gewebe wurde in 1-2 ml des Reagenzes aufgenommen und mittels eines Homogenisators (Ultra-TURRAX[®], T25 basic, IKA Werke) homogenisiert. Auf 1 ml TRIZOL[®]-Reagenz

erfolgte eine Zugabe von 200 µl Chloroform. Nach 2 min Inkubationszeit folgten 15 min Zentrifugation bei 12.000x g und 4 °C. Die wässrige (obere) Phase wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol gemischt. Die Lösung ruhte für 10 min bei RT und wurde anschließend bei 12.000x g und 4 °C 10 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 1 ml 75 %igem Ethanol gewaschen und bei 7.500x g 5 min und 4 °C erneut zentrifugiert. Das erhaltene RNA-Pellet wurde an der Luft getrocknet und in 30 bis 50 µl ddH₂O resuspendiert. Die Konzentration und Reinheit der gewonnenen RNA wurden photometrisch bestimmt.

3.16.2 *Synthese der cDNA*

Die cDNA-Synthese erfolgte mittels eines High-Capacity cDNA Transcription-Kits der Firma Applied Biosystems. Die Durchführung der Synthese erfolgte nach Anweisung des Herstellers. Für jeden Ansatz wurden 5 µg total-RNA eingesetzt, die 1:5 mit ddH₂O verdünnt wurden. Für die Kontrolle (ohne MultiScribe Reverse Transcriptase) wurde ein geringeres Volumen von 25 µl und 2,5 µg RNA eingesetzt. Um sowohl die Qualität als auch die Quantität der cDNA-Synthese zu kontrollieren, wurde eine PCR mit β-Aktin Primern durchgeführt. Das-PCR Produkt wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

3.16.3 *Quantitative Real-Time-PCR*

Bevor eine quantitative Bestimmung der Genexpression durchgeführt werden konnte, sollte zunächst die Effizienz der Sonden geprüft werden. Hierzu wurde eine Standardkurve aus unterschiedlichen Verdünnungsstufen der cDNA erstellt. Stark exprimierte cDNA wurde 1:5 in 5 Stufen verdünnt. Die eingesetzte Menge an cDNA wurde in einer logarithmischen Funktion gegen die Zyklenzahl (Ct) dargestellt. Anhand der Steigung wurde die Effizienz der Sonden nach folgender Formel errechnet: $(10^{-1/\text{Steigung}})-1 \cdot 100$. Die erhaltenen Effizienzen sollten zwischen 90 % und 110 % liegen. Für die Effizienzbestimmung der quantitativen Real-Time-PCR (qRT-PCR)-Assays wurde Hippocampus-cDNA aus der Maus verwendet. Hiervon ausgenommen waren die Assays für den LPA3- und den LPA5-Rezeptor. Da diese beiden Rezeptoren nicht im Gehirn exprimiert werden, wurde hier cDNA aus der Milz eingesetzt.

Bei allen qRT-PCR-Ansätzen wurden Zweifachbestimmungen durchgeführt und eine Wasserkontrolle für jedes Gen mitgeführt. Für jedes Ergebnis wurde eine Dreifachbestimmung (total-

RNA Präparation von 3 unterschiedlichen Tagen) durchgeführt. Um eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen, wurden bei allen verwendeten cDNA-Proben die Kontrollen verwendet, welche bei der cDNA-Synthese ohne Reverse Transkriptase mitgeführt wurden. Alle verwendeten Reagenzien wurden von der Firma Applied Biosystems bezogen. Exemplarisch ist in Tabelle 7 ein Ansatz für die Real-Time-Reaktion dargestellt.

Tabelle 7: Pipettieransatz für ein Real-Time-PCR-Experiment

Additive	Vorgefertigte Assays (µl)	HPRT (µl)
ddH ₂ O	8	3,4
2x TaqMan Universal PCR-Mastermix	10	10
20x Primer und Sonde-Mix	1	-
Primer-Mix (Stock: 10 pmol)	-	4,8
Sonde (Stock: 5 pmol)	-	0,8
cDNA	1	1

Die verwendeten TaqMan Sonden waren am 5'-Ende mit einem Reporter-Farbstoff (Fam: 6-Carboxy-Fluorescein) und am 3'-Ende mit einem Quencher markiert. In der Tabelle 8 ist das Amplifikationsprogramm für einen Standard-RT-PCR-Lauf gezeigt.

Tabelle 8: PCR-Bedingungen für die Amplifikation

Schritt	Temperatur in °C	Zeit	Zyklenzahl
1	50 °C	2 min	
2	95 °C	10 min	
3	95 °C	15 sek	40
4	60 °C	1 min	
5	25 °C	∞	

Die Auswertung und der Export der erhaltenen digitalen Daten erfolgte mittels einer 7500 Fast System SDS Software (Version 1.3.1) der Firma Applied Biosystems. Die Expression der Zielgene wurde relativ zu 2 nicht regulierten Haushaltsgenen ins Verhältnis gesetzt und auf diese Weise normalisiert. Das dimensionslose Ergebnis der Berechnung des Expressionsunterschiedes (Ratio) wurde wie folgt angegeben:

1. Bildung des ΔC_t -Wertes

$$\Delta C_t = C_t \text{ Zielgen} - C_t \text{ Referenzgen}$$

2. Berechnung des Ergebnisses

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta C_t}$$

Alle nach der PCR erhaltenen Daten wurden mittels der oben beschriebenen Formeln berechnet und anschließend mittels Microsoft Excel Software in Form eines Diagrammes graphisch dargestellt.

Für die Bestimmung der x-fachen mRNA-Menge von PRG1 bzw. Tuj1 in undifferenzierten, zu Neuronen oder Kardiomyocyten ausdifferenzierten embryonalen Stammzellen wurde folgende Berechnung verwendet:

$$2^{(\text{Ct PRG1 oder Tuj1 Normal-Gen} - \text{Ct PRG1 oder Tuj1 Testgen})} / 2^{(\text{Ct GAPDH Normal-Gen} - \text{Ct GAPDH Testgen})}$$

Dabei diente cDNA aus undifferenzierten Zellen als „Normalisierungsgen“. Das „Testgen“ stellte in diesem Fall cDNA aus differenzierten Neuronen oder Kardiomyocyten dar.

3.17 Fura-2-Messung

Für die Bestimmung intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen wurden primäre Neurone in 6-Well-Platten ausplattiert (5×10^5 Zellen/Well) und 5-6 Tage kultiviert. Am Tag der Messung wurden die Zellen mit Fura-2/AM-Farbstoff der Firma Invitrogen (Endkonzentration $2 \mu\text{M}$) beladen und 30 min bei 37°C im Brutschrank unter Standardbedingungen inkubiert. Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 ist zellmembranpermeabel und dient als intrazellulärer Calciumindikator. Aufgrund hoher und selektiver Calciumaffinität ist Fura-2 für die Messungen im physiologischen Bereich ($\sim 0,1 \times 10^{-6}$) sehr geeignet. Das Acetoxymethylester wird in der Zelle durch Esterasen hydrolysiert. Auf diese Weise entsteht ein nicht membranpermeabler Polycarboxylat-Indikator. Nachdem zweiwertige Calciumionen gebunden werden, kommt es zu einer Veränderung in der Struktur des elektronischen Energieniveaus und damit zu einem geänderten Absorptionsverhalten des Fura-2-Moleküls. Nach der Inkubation wurde das Glasplättchen in die Messkammer eingespannt und an das Perfusionssystem angeschlossen. Die Zellen wurden für 5 bis 10 min mit HEPES (15 mM) gepufferter HBSS-Lösung (Biochrom, pH 7,4) mit einer Flussrate von 1 ml/min gespült und anschließend 10 bis 15 min inkubiert. Die Aufnahmen erfolgten mittels Calcium-Imaging-Systems (Till-photonics GmbH), angeschlossen an ein inverses Olympus Mikroskop (IX70). Um die Konzentration von freiem Calcium zu bestimmen, wurde zunächst eine Ratio-Messung bei 340/380 nm in einem Intervall von 10 sek durchgeführt. Die Applikation von Agonisten erfolgte direkt auf die Zellen. Einzelne Zellen wurden markiert und nach der Stimulation sofort eine Calciumkinetik aufgezeichnet (alle 5 sek ein Bild). Danach wurden die Zellen mit HEPES gepufferter HBSS gewaschen und für mindestens 15 min ruhen gelassen, bevor eine erneute Stimulation stattfinden kann.

te. Für die pharmakologischen Stimulationen wurde die HBSS-Lösung von den Zellen entfernt und durch Inhibitor-Lösung ersetzt. In Tabelle 9 sind alle verwendeten Inhibitoren zusammengefasst, die im Rahmen dieser Arbeit für die Calcium-Messungen eingesetzt wurden.

Tabelle 9: Zusammenfassung verwendeter Inhibitoren

Substanz	Inhibierung	Inkubationszeit	Endkonzentration	Lösungsmittel	Hersteller
Pertussistoxin (PTX)	G _i -Protein	10 min	100 ng/ml	H ₂ O	Calbiochem
ω-Agatoxin TK (ω-Aga-TK)	P/Q-Typ-Ca ²⁺ - Kanäle	5 min	2 μM	H ₂ O	Biomol
U-73122	PLC-Agonist	5 min	5 μM	DMSO	Calbiochem
U-73343	PLC-Antagonist	5 min	5 μM	DMSO	Calbiochem
Xestospongin C (XeC)	IP ₃ R	5 min	1 μM	DMSO	Biomol
ω-Conotoxin-GVIA (ω-Con)	N-Typ-Ca ²⁺ -Kanäle	5 min	500 nM	H ₂ O	AnaSpec
Nifedipin	L-Typ-Ca ²⁺ -Kanäle	5 min	10 μM	DMSO	Tocris
SNX-482	R-Typ-Ca ²⁺ -Kanäle	5 min	1 μM	H ₂ O	Tocris
Thapsigargin (Thg)	Ca ²⁺ -ATPase	direkte Applikation	5 μg/ml	DMSO	Tocris

Für jede Versuchsreihe wurden neuronale Kulturen von 3 unterschiedlichen Präparationstagen verwendet. Dabei wurden mindestens 2 Glasplättchen und 50 Zellen gemessen, um ein Ergebnis für die Dreifachbestimmung zu erhalten. Aus allen gesammelten Daten zu einem Experiment wurden zunächst die Mittelwerte gebildet. Anschließend erfolgte eine statistische Auswertung mittels der SPSS Statistics 17.0 Software. Für die statistischen Analysen wurde der Student's t-Test oder der Mann-Whitney-U-Test unabhängiger Stichproben eingesetzt. Als statistisch signifikant wurde ein Unterschied zweier Stichproben mit einem p-Wert kleiner als 0,05 betrachtet. Alle Unterschiede, die einen größeren p-Wert hatten, wurden als statistisch nicht signifikant behandelt.

3.18 SynaptopHluorin-Messungen

Für die SynaptopHluorin-Messungen an lebenden Zellen (*live imaging*) wurde ein Vektor-Konstrukt verwendet, welches für folgende Gene kodiert: Vesikel-Membranprotein, Synaptophysin I (SytI) und pH-sensitives GFP (pHluorin). Das Prinzip beruht darauf, dass ein pHluorin an dem N-terminalen-Ende des SytI fusioniert und so im Inneren des Vesikels lokalisiert ist. Durch den saureren pH-Wert von ~ 5,5 im Vesikel-Lumen wird die Fluoreszenz des pHluorins bis zum Zeitpunkt der Exozytose unterdrückt. Nach der Vesikelfreisetzung und Änderung des pH-Wertes auf das des extrazellulären Milieus (~ 7,3) kommt es zu einer starken Fluoreszenzzunahme des pHluorins.

Hippocampale Neurone wurden in 12-Well-Platten mit einer Dichte von 8×10^4 Zellen/Well ausplattiert und 7-10 Tage kultiviert. Es folgte eine Transfektion mit Effectene. 3-5 Tage später erfolgte die Messung. Die Hälfte des Wachstumsmediums wurde 2 Mal in der Woche durch frisches Medium ersetzt. Für die Messungen wurden die Deckgläschen in eine Messkammer mit HBSS-Lösung, versetzt mit $1 \mu\text{M}$ Tetrodotoxin (Tocris), überführt. Für die Aufnahmen wurde auf transfizierte Zellen fokussiert, die keine zu starke Expression von SynaptopHluorin zeigten. Das *live imaging* erfolgte an einem inversen Mikroskop (IX81, Olympus) mit einer hochauflösenden CCD-Kamera (F-View II, Soft Imaging System GmbH). Es wurde ein 100x Öl-Objektiv mit NA von 1,3 und GFP-Filterset (DCLP 505, BP 525/50) eingesetzt. Die Aufnahmen erfolgten alle 2 sek mit einer Gesamtdauer von 8 min. Die Zugabe von LPA oder L-Glutamat erfolgte direkt auf die Zellen, sobald mindestens 10 Bilder aufgenommen worden waren. Nach der Messung wurde um jedes Vesikel, abhängig von der Größe (2 bis $4 \mu\text{m}$), eine ROI gesetzt und die Fluoreszenzintensität und Dauer im Verlauf der Serie mit der Software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) bestimmt.

3.19 FuraRed Ca^{2+} -Messung

Für die Bestimmung der Calciumkonzentrationen in den synaptischen Terminalinen wurden primäre hippocampale Neurone in 12-Well-Platten ausplattiert (8×10^4 Zellen/Well) und 4-5 Tage kultiviert. Anschließend erfolgte eine transiente Transfektion mit SynaptopHluorin mittels Effectene. Die Zellen wurden weitere 3-4 Tage kultiviert bis die Messung erfolgte. Für die Messung wurden die Zellen mit FuraRed/AM-Farbstoff (Firma Invitrogen) beladen und 30 min bei 37°C im Brutschrank unter Standardbedingungen inkubiert. Nach der Inkubation mit FuraRed wurden die Zellen für weitere 30 min bei RT in HEPES (15 mM) gepufferter HBSS-Lösung inkubiert um das überschüssige FuraRed von Zellen zu entfernen. Das Glasplättchen wurde anschließend in die Messkammer mit HBSS-Lösung, versetzt mit Tetrodotoxin ($1 \mu\text{M}$), eingespannt. Für die Aufnahmen wurde auf transfizierte Zellen fokussiert, die keine zu starke Expression von SynaptopHluorin zeigten. Die Messung erfolgte an einem inversen Mikroskop (IX81, Olympus) mit einer hochauflösenden CCD-Kamera (F-View II, Soft Imaging System GmbH). Es wurde ein 100x Öl-Objektiv mit NA von 1,3 und GFP-Filterset für SynaptopHluorin (DCLP 505, BP 525/50) und FuraRed-Filterset für FuraRed (FuraRed Ca^{2+} -bound 490) eingesetzt. Die Aufnahmen erfolgten alle 8 sek mit einer Gesamtdauer von 3 min. Die Zugabe von LPA erfolgte direkt auf die Zellen, sobald mindestens 10 Bilder aufgenommen worden waren. Nach der Messung wurde um jeden SynaptopH-

luorin-positiven Bereich, abhängig von der Größe (2 bis 4 μm), eine ROI gesetzt und die Fluoreszenzintensität im Verlauf der Serie mit der Software Cell[^]P (Olympus) bestimmt.

4 Ergebnisse

4.1 Expressionsstudien von PRG1

4.1.1 Polyklonaler Peptidantikörper gegen PRG1

Um Funktions- und Lokalisations-Untersuchungen des PRG1-Proteins in komplexen Proteinpräparaten und Zellkulturversuchen durchführen zu können, sollte ein spezifischer Antikörper gegen PRG1 gewonnen werden. Zur Herstellung des polyklonalen Antikörpers wurden Kaninchen mit kurzen synthetischen Peptidsequenzen, welche identisch zu zwei unterschiedlichen Bereichen des C-Terminus von PRG1 waren, immunisiert (Abbildung 7 C). Die Antiseren für beide Peptide waren bereits vorhanden und sollten im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Spezifität hin untersucht und das reaktivste Serum mittels Affinitätschromatographie über eine Festbettsäule aufgereinigt werden. Insgesamt waren vier Seren aus vier Kaninchen für die beiden Peptide vorhanden. Abbildung 7 (A und B) zeigt die Spezifität der Antiseren gegen beide Immunisierungspeptide vor der Aufreinigung im Immunblot.

Auf dem Blot ist rekombinantes eGFP-mPRG1-Fusionsprotein, Proteinhomogenat aus Maus-Neocortex am postnatalen Tag 10 und 15 (P10 und P15) und das Zelllysate aus HEK293-Zellen, welche eGFP-mPRG1 Fusionsprotein überexprimierten, aufgetragen. Die Abbildung 7 zeigt die Immunblots für das Peptid mit den AS 524 bis 538 und das Peptid mit den AS 660 bis 673. Banden, welche von Seren erkannt und ungefähr auf der Höhe des theoretischen Molekulargewichtes von PRG1 (83 kDa) detektiert wurden, sind mit Pfeilen markiert.

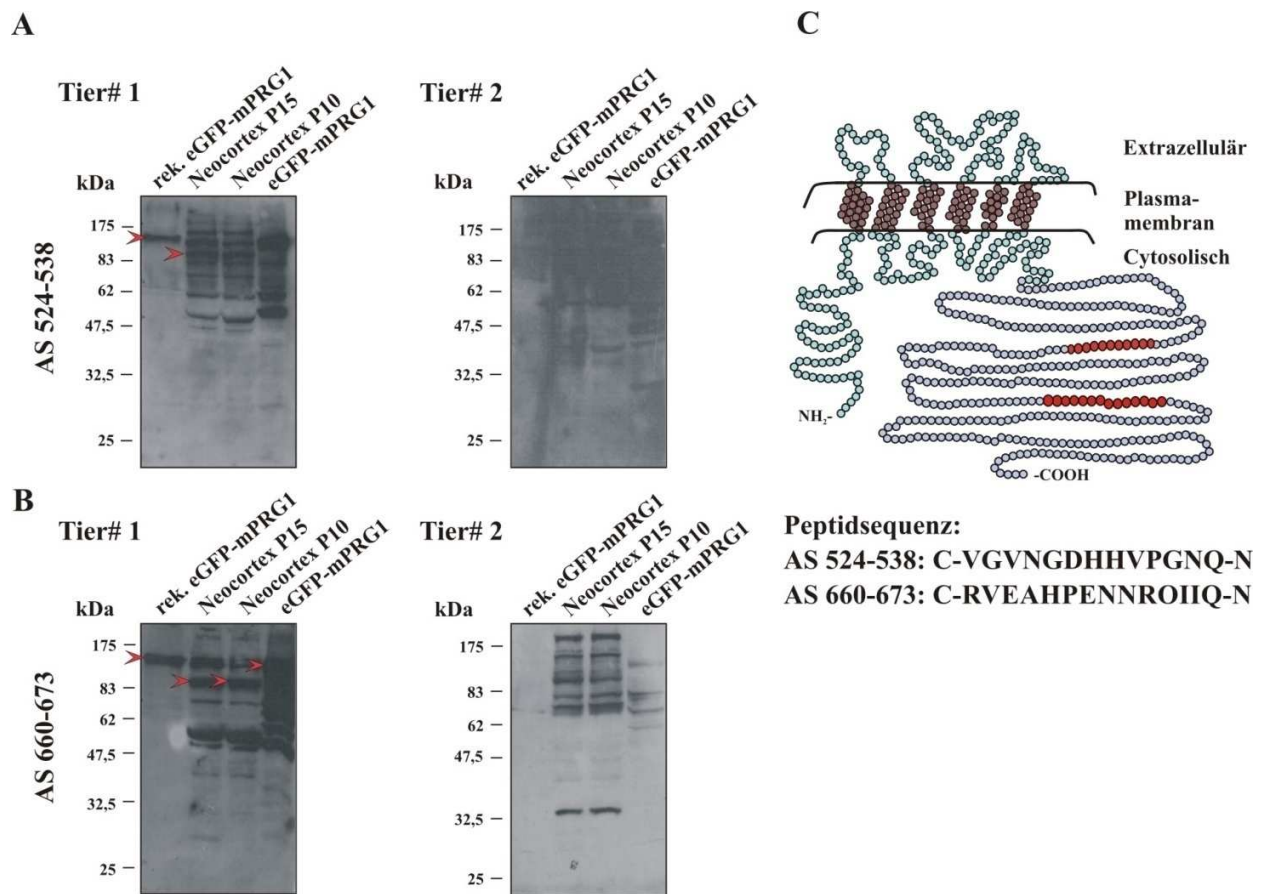


Abbildung 7: Spezifitätstest der Antiseren vor der Aufreinigung.

Dargestellt sind repräsentative Immunblots der zur Verfügung stehenden Immunsereen vor der Affinitätsaufreinigung. Für jedes Peptid wurden zwei Kaninchen immunisiert und daher insgesamt vier Seren dem Spezifitätstest unterzogen. **A:** Immunblots für das Peptid, dessen Sequenz zwischen den AS 524 und 538 im C-terminalen Bereich liegt. Das Tier# 1 zeigte eine Immunantwort und kann sowohl das rekombinante PRG1 als auch das endogene Protein im Gewebelysate erkennen (mit Pfeilen markiert). Das Serum aus dem Tier# 2 zeigte nicht die gewünschte Spezifität für PRG1. **B:** Darstellung beider Seren gegen die Peptidsequenz im Bereich der AS 660 und 673. Das Serum aus Tier# 1 zeigte eine starke Immunantwort und hohe Spezifität gegenüber PRG1. Tier# 2 zeigte nur unspezifische Banden und konnte das rekombinante PRG1 nicht erkennen. **C:** Zweidimensionales Topologiemodell des PRG1-Proteins (NCBI-Nummer AF541279) mit rot gekennzeichneten Antikörperererkennungssequenzen und ausgeschriebenen Peptidsequenzen. Rekombinantes eGFP-mPRG1, über μ MacS-Säulen aufgereinigt, Totalproteinlysat aus dem Maus-Neocortex (P10 und P15, 40 μ g), HEK-Zelllysat nach der transienten Überexpression mit dem eGFP-mPRG1-Fusionsprotein.

Nach dem Spezifitätstest im Western Blot zeigt das Antiserum aus Tier# 1 für das Peptid, dessen Sequenz in der C-terminalen Region zwischen AS 660 und 673 liegt, das beste Ergebnis (Abbildung 7 B). Das Serum weist nicht nur ein spezifisches Signal in der Spur mit dem rekombinanten und überexprimierten PRG1-Protein mit erwartetem Molekulargewicht nach, sondern erkennt auch das endogene PRG1 aus Maus-Neocortex. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde dieses Antiserum für die Affinitätsaufreinigung des PRG1-Antikörpers verwendet. Die übrigen Seren

wurden aufgrund ihrer unzureichenden Spezifität bei weiteren Experimenten außer Acht gelassen.

Nach der Aufreinigung sollte zunächst geprüft werden, ob das Experiment erfolgreich verlaufen war. Anschließend sollte der gewonnene PRG1-Antikörper mehreren Spezifitätstests unterzogen werden. Dafür wurden Immunblots hergestellt und die Bindungsspezifität des Antikörpers überprüft. In Abbildung 8 sind die Western Blots dargestellt, welche mit aufgereinigtem anti-PRG1 inkubiert wurden. Die Abbildung 8 A zeigt die hohe Reaktivität des aufgereinigten Antikörpers gegenüber dem rekombinanten und endogenen PRG1-Protein. Der Antikörper detektiert keinerlei unspezifische Banden und keine Hintergrundsignale. Dies spricht für eine erfolgreiche Aufreinigung des Antikörpers aus dem Serum.

Weiterhin wurde ein Test durchgeführt, bei dem während der Immunreaktion anti-PRG1 in Kombination mit BSA oder dem Immunisierungspeptid inkubiert wurde. Dieses Experiment diente der Bestätigung der Antikörper-Spezifität. Das Ergebnis ist in der Abbildung 8 B und C gezeigt. Die Zugabe von BSA hatte keinerlei Auswirkungen auf das Bindungsverhalten des Antikörpers und liefert ein identisches Muster zu Abbildung 8 A. In Abbildung 8 C wurde präsentiert, dass der gesamte Antikörper vollständig an das im Überschuss vorliegende Peptid gebunden hat und demnach kein Signal entstand. Auf diese Weise konnte zusätzlich die Spezifität des Antikörpers demonstriert werden.

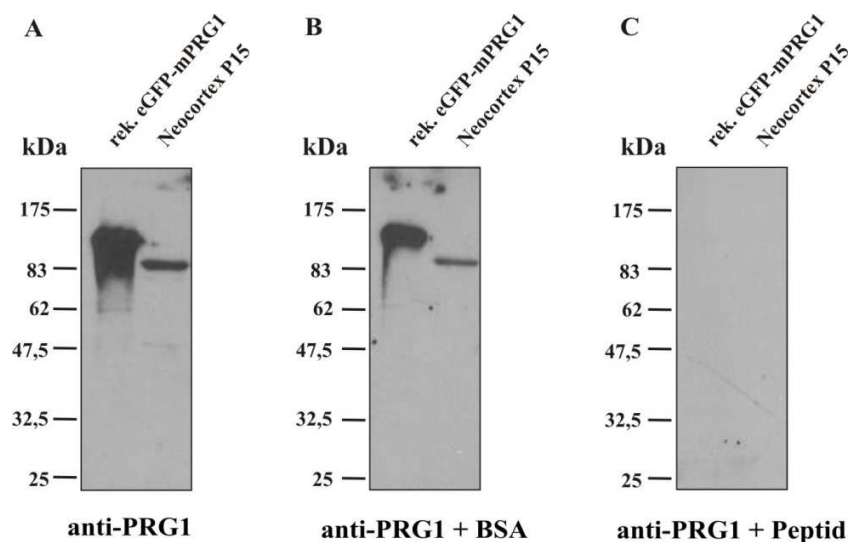


Abbildung 8: Spezifitätstest des aufgereinigten PRG1 Antikörpers.

A: Der aufgereinigte Antikörper erkannte sowohl rekombinantes als auch endogenes PRG1. **B:** Die Detektion erfolgte mit anti-PRG1 in Kombination mit BSA. Das Bandenmuster blieb identisch zu dem in Abbildung A. **C:** Für die Inkubation mit anti-PRG1 und Immunisierungspeptid konnten keine Banden detektiert werden. In jedem Versuch wurden affinitätsaufgereinigtes eGFP-mPRG1-Fusionsprotein und 30 µg Proteinlysate aus Maus-Neocortex aufgetragen. BSA und Immunisierungspeptid 1 mg/ml in 1x PBS.

Bereits in früheren Untersuchungen konnte mittels Northern Blot-Analysen gezeigt werden, dass PRG1 spezifisch im Gehirn exprimiert wird [76]. Mit dem gewonnenen Antikörper sollte nun überprüft werden, ob tatsächlich auch das PRG1-Protein nur im Gehirn hergestellt wird. Dies wurde ebenso auch für andere Gewebe vergleichend analysiert. Dafür wurden aus unterschiedlichen Mausgeweben Proteine isoliert und im Immunblot mit dem anti-PRG1 detektiert. Abbildung 9 zeigt das Ergebnis: Eine Bande in Höhe von ungefähr 90 kDa war nur im Gehirn zu erkennen. In keinem der weiteren untersuchten Gewebe konnte ein Signal für PRG1 oder unspezifische Banden nachgewiesen werden. Als Beladungskontrolle der aufgetragenen Proteinmenge im Western Blot wurde anti-GAPDH verwendet. Der Vergleich der GAPDH-Banden in den Gewebehomogenaten zeigte eine gleichmäßige Proteinbeladung.

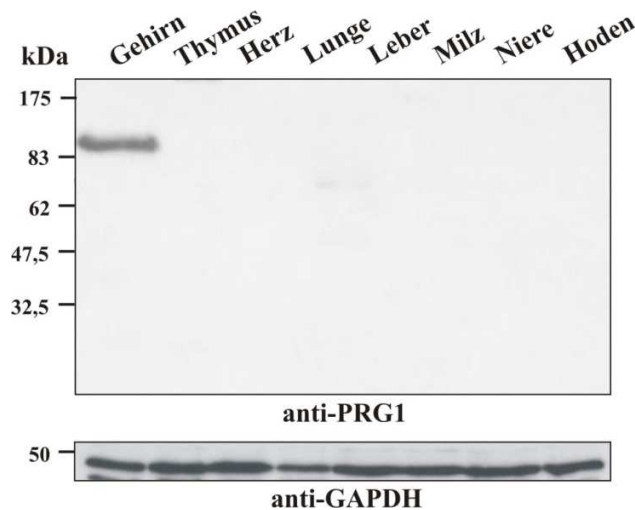


Abbildung 9: PRG1-Protein ist gehirnspezifisch.

Repräsentativer Immunblot verschiedener Mausgewebe. Das verwendete Proteinhomogenat stammt aus einer P5-Maus. 30 µg Protein für jedes Gewebe wurden ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Detektion der transferierten Proteine erfolgte mit anti-PRG1 und zeigte ausschließlich im Gehirn eine PRG1-Bande. Die aufgetragene Proteinmenge wurde durch anti-GAPDH markiert.

Um weitere Beweise für die Spezifität des Antikörpers zu liefern, wurde ein Western Blot erstellt, auf dem das Proteinlysate aus dem Gehirn einer PRG1-*knock out* (KO)-Maus aufgetragen

wurde. Als Kontrolle diente das Gehirn-Proteinlysate einer Wildtyp-Maus. Das Ergebnis ist in Abbildung 10 dargestellt.

Die Kontrolle zeigt für das anti-PRG1 typische Signal im Immunblot mit einer klaren Bande um die 90 kDa. Im Gegensatz dazu konnte keine Bande im PRG1-KO-Hirngewebe detektiert werden, was die Spezifität des Antikörpers endgültig beweist.

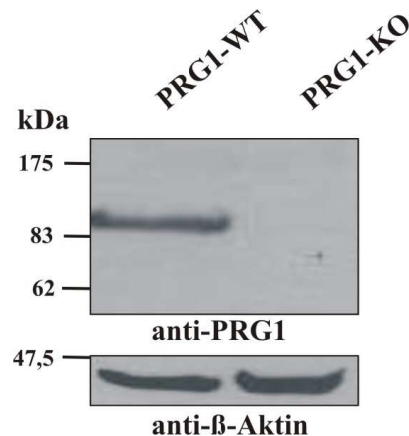


Abbildung 10: PRG1-Antikörper zeigt keine Bande im PRG1-knock out-Gehirn.

Das Gesamtproteinlysate aus dem Gehirn einer Wildtyp- (PRG1-WT) und einer PRG1-KO-Maus (PRG1-KO) wurde in der SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem PRG1-Antikörper detektiert. Als Beladungskontrolle diente eine Detektion von β -Aktin, aufgetragene Proteinmenge: 30 μ g.

Um die Spezifität des in dieser Arbeit aufgereinigten Antikörpers nachzuweisen, wurden mehrere Immunblots mit unterschiedlichen Versuchsproben durchgeführt. Insgesamt konnte mit allen durchgeführten Tests gezeigt werden, dass die Aufreinigung erfolgreich verlaufen ist und zu dem gewünschten Ergebnis führte, einen hochspezifischen Antikörper gegen PRG1 zu gewinnen.

4.1.2 PRG1 ist spezifisch in Neuronen exprimiert

Aus früheren Untersuchungen und aus in dieser Arbeit erhobenen Daten geht hervor, dass eine PRG1-Expression ausschließlich im Gehirn stattfindet. Darüber hinaus wurden parallel zu dieser Arbeit immunhistochemische Analysen in Hirnschnitten der Maus durchgeführt (in Zusammenarbeit entstandene und mittlerweile von Trimbuch *et al.* publizierte Daten), welche die Lokalisation von PRG1 in glutamatergen Neuronen zeigten [77]. Allerdings wurde bis jetzt auf Proteinebene noch nicht nachgewiesen, in welchen Zellsubtypen des ZNS das PRG1-Protein vorkommt. Darüber hinaus wurde noch nicht untersucht, ob Zelllinien neuronalen Ursprungs eben-

falls PRG1 exprimieren. Um dies experimentell zu untersuchen, wurden Proteine aus primären Neuronen-, Astrozyten- und Microglia-Kulturen isoliert und einer Western Blot-Analyse unterzogen. Zusätzlich wurden Proteinpräparationen aus heterologen Zelllinien analysiert. Nach dem Transfer der Proteine aus dem SDS-Gel wurde der Nachweis mit anti-PRG1 mittels Immunblot erbracht.

Wie in Abbildung 11 A ersichtlich ist, konnte eine starke PRG1-Bande nur in primären hippocampalen Neuronen detektiert werden. Im Astrozyten- und Microglia-Zelllysate war dagegen auch nach längerer Exposition keine Bande sichtbar. Als Kontrolle des Proteingehaltes für den entsprechenden Zelltyp wurden die Blots anschließend mit bekannten Markern für Neuronenspezifische Klasse III β -Tubulin (anti-Tuj1), Microglia-Zellen (anti-Iba-1) und Astrozyten (anti-GFAP) inkubiert.

Die Abbildung 11 B zeigt eine PRG1-typische Bande nur in murinen Neuronen. Weder in der neuronalen Stammzelllinie (NSC-34) noch in der Neuroblastoma-Zelllinie (N1E-115) konnte eine Bande mit anti-PRG1 detektiert werden. Die HEK293-Zellen wurden als nicht neuronale Zellen als Kontrolle verwendet. In beiden Experimenten wurde anschließend β -Aktin als Kontrolle für die Proteinkonzentration untersucht.

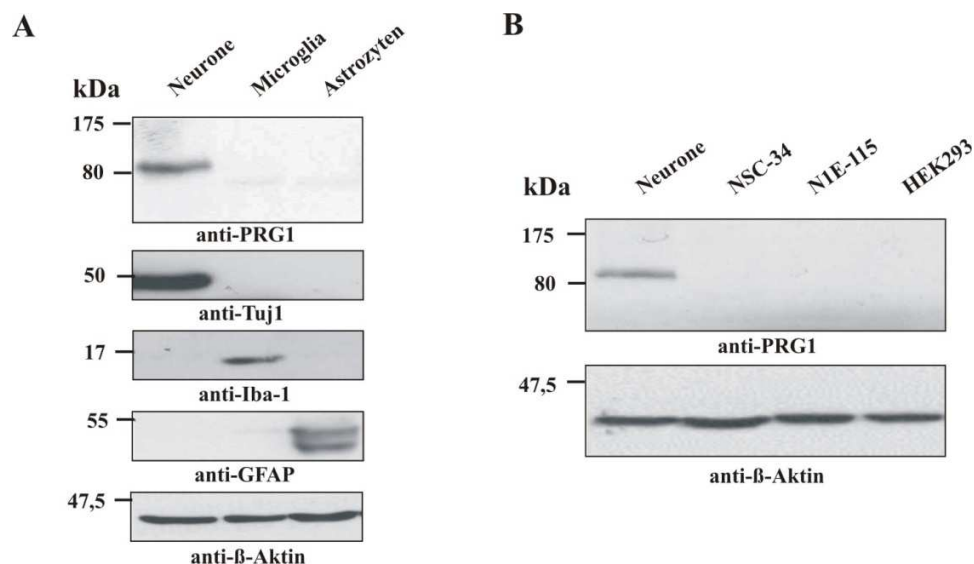


Abbildung 11: PRG1-Expressionsnachweis in primären Zellkulturen und heterologen Zelllinien.

A: Primäre Zellen wurden aus embryonalen bzw. früh postnatalen Mäusen isoliert und anschließend die hippocampalen Neurone 7 Tage, die Microglia-Zellen und Astrozyten 14 Tage kultiviert. 20 μ g Proteinextrakte wurden in einer SDS-PAGE-Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Eine Detektion erfolgte mit anti-PRG1, anti-Tuj1 als Kontrolle für die Neurone, anti-Iba-1 als Marker für Microglia und anti-GFAP als Marker für Astrozyten. Als Ladekontrolle erfolgte eine anschließende Inkubation mit anti- β -Aktin. **B:** Extrahiertes Proteinlysate aus Zelllinien

wie NSC-34 (*neural stem cells*), N1E-115 (Maus-Neuroblastom), HEK293 (*human embryonic kidney*) und primären hippocampalen Neuronen als Positivkontrolle. Es wurden 20 µg Protein pro Spur aufgetragen. Immunblots wurden anschließend mit einem β -Aktin-Antikörper inkubiert, welcher als Nachweis der Ladekontrolle diente.

Die erzielten Ergebnisse auf Proteinebene haben gezeigt, dass PRG1-Protein nicht nur im Gehirn, sondern spezifisch in Neuronen exprimiert wird. Sowohl in Astrozyten oder Microglia-Zellen als auch in verschiedenen neuronalen Zelllinien konnte keine Bande für PRG1 im Immunblot detektiert werden.

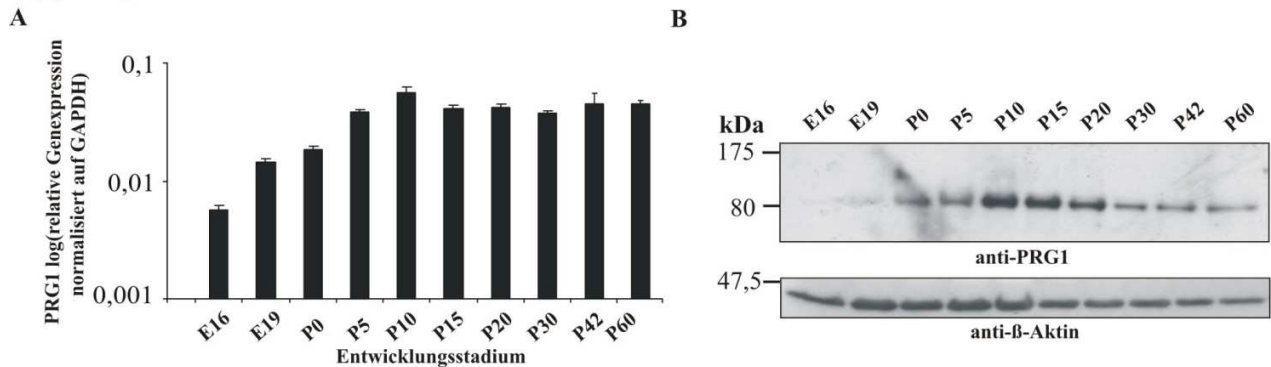
4.1.3 *PRG1-Expression während der Entwicklung des ZNS in der Maus*

Das Expressionsmuster eines Proteins während des Entwicklungsstadiums eines Organismus kann wichtige Hinweise im Hinblick auf seine Funktion geben. Frühere und eigene Untersuchungen zeigten eine Spezifität von PRG1 für Neurone. Es sollte nun in weiteren Studien untersucht werden, wie die Expression von PRG1 während der Entwicklung des ZNS in der Maus reguliert ist. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden zwei unterschiedliche Versuchansätze verfolgt. Zum einen wurden die Transkriptionsniveaus auf mRNA-Ebene mit Hilfe einer quantitativen Real-Time-PCR (qRT-PCR) untersucht, zum anderen wurde parallel die Genexpression auf Proteinebene im Immunblot analysiert. Es wurden unterschiedliche Entwicklungsstadien aus dem Hippocampus zwischen dem embryonalen Tag 16 (E16) und dem postnatalen Tag 60 (P60) sowie Neocortex E14 bis P60 für die Untersuchungen herangezogen. Am embryonalen Tag 14 ist der Hippocampus noch nicht vollständig ausgebildet und demnach für die Untersuchung nicht geeignet. Um die relative Genexpression bestimmen zu können, wurden zunächst geeignete *Housekeeping Gene* (Referenzgene) getestet und ausgewählt. Für alle Untersuchungen wurden zwei *Housekeeping Gene* eingesetzt. Zur besseren Übersichtlichkeit werden hier nur Auswertungen bezogen auf ein *Housekeeping Gene* gezeigt. Die Normalisierung der Transkriptionshäufigkeit erfolgte anhand der Menge von ubiquitär exprimierten GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase). Im Western Blot diente β -Aktin als Kontrolle für die Konzentration der aufgetragenen Proben.

Die gewonnenen Ergebnisse aus den beiden angewandten Methoden waren in ihrer Gesamtaussage konform. Die qRT-PCR zeigte eine geringe Transkription der PRG1-mRNA im Hippocampus am E16 (Abbildung 12 A). Im weiteren Entwicklungszeitrahmen des Hippocampus konnte eine Erhöhung der Expression festgestellt werden, wobei die maximale Konzentration der

PRG1-Transkripte am P10 erreicht wurde. Auf Proteinebene konnte eine schwache PRG1-Bande ab E19 detektiert werden (Abbildung 12 B). Die Intensität der Banden zeigte mit zunehmender Entwicklung, wie auch bei der qRT-PCR, eine immer stärkere Ausprägung mit einem Peak zwischen P10 und P15. Im Neocortex deckten sich die Ergebnisse aus qRT-PCR und Immunblot (Abbildung 12 C und D). Die stärkste PRG1-Expression wurde in frühen postnatalen Stadien gezeigt. Im Vergleich zum Hippocampus wurde im Neocortex sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene ein späterer Start für die PRG1-Expression nachgewiesen; das Maximum wird hier erst im Stadium P15 beobachtet.

Hippocampus



Neocortex

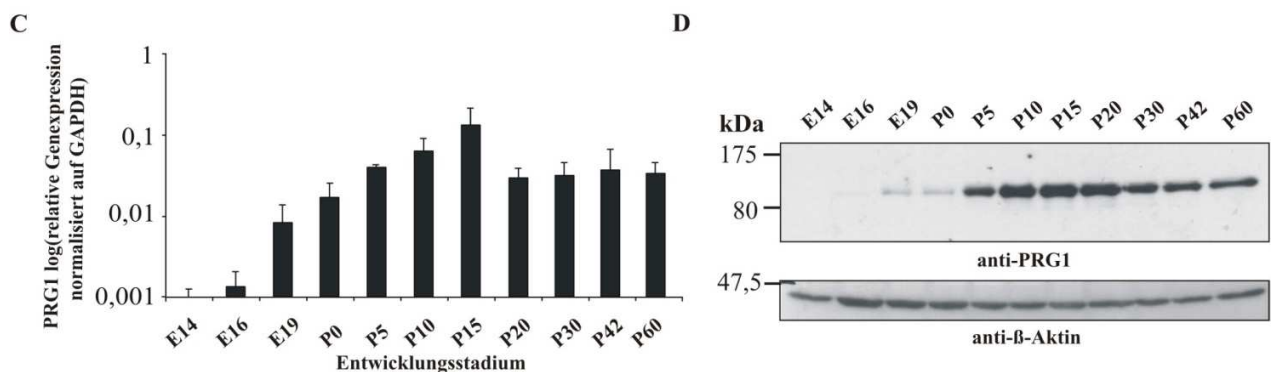


Abbildung 12: Regulation der PRG1-Expression während der Entwicklung im ZNS der Maus.

Quantitative RT-PCR- und Immunblot-Analysen des PRG1-Expressionsverhaltens während der Entwicklung von Hippocampus und Neocortex der Maus. Für die Analysen wurde das entsprechende Hirnareal präpariert und daraus total-RNA bzw. Proteine isoliert. Die Ergebnisse für den Hippocampus der qRT-PCR **A** decken sich mit denen des Immunblots **B** und zeigen die stärkste PRG1-Expression am postnatalen Tag 10-15. Die Analyse im Neocortex zeigte die stärkste PRG1-Expression am postnatalen Tag 15 in der qRT-PCR **C** und im Immunblot **D**. Für die Untersuchung wurde das Gewebe aus mindestens drei Mäusen vereinigt. Als Normalisierung diente das *Housekeeping Gene* GAPDH. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD von $n = 3$ Experimenten. Für die Immunblots wurden 10 μ g Proteinlysate in jeder Gelspur aufgetragen. Anti- β -Aktin diente als Ladekontrolle der Proteine.

In einem weiteren Schritt sollte die Expression von PRG1-Protein im Cerebellum und Bulbus olfactorius im Immunblot semiquantitativ bestimmt werden (Abbildung 13 A und B). Sowohl im Cerebellum als auch im Bulbus olfactorius wurde ein ähnliches Expressionsmuster wie im Hippocampus und Neocortex beobachtet. Das endogene PRG1 wurde auch in diesen Geweben in frühen postnatalen Stadien am stärksten exprimiert.

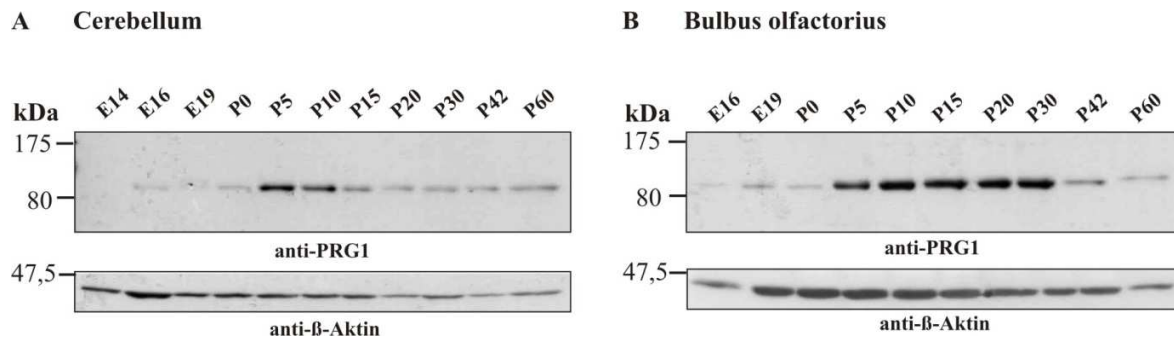


Abbildung 13: PRG1-Expression während der Entwicklung von Cerebellum und Bulbus olfactorius.

Die Proteine wurden aus Cerebellum und Bulbus olfactorius der Maus zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung isoliert und in der SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion der transferierten Proteine erfolgte mit anti-PRG1 und β -Aktin als Ladekontrolle, 10 μ g Protein pro Spur wurden verwendet.

Eigene Untersuchungen haben eine Spezifität von PRG1 für Neurone nachgewiesen. Eine weitere Untersuchung an der embryonalen Stammzelllinie D3 der Maus (mES) sollte zeigen, ob die PRG1-Expression während der neuronalen Differenzierung *in vitro* beeinflusst wird. Dabei handelt es sich um pluripotente Zellen, die aus der inneren Zellmasse der Mausblastocyste gewonnen wurden [107]. Pluripotente embryonale Stammzellen besitzen das einzigartige Potential, zu allen Geweben zu differenzieren und können somit als ein Modellsystem zur Analyse der frühen Entwicklungsprozesse, wie sie *in vivo* im Embryo ablaufen, verwendet werden. Bei Kultivierung mit dem Leukämie-inhibierenden Faktor (mLIF) werden die embryonalen Stammzellen in ihrer Differenzierung gehemmt und verbleiben im undifferenzierten Zustand. Zur Differenzierung von mES zu adulten Neuronen wurde das mLIF entzogen. Die dissoziierten Zellen wurden auf gelatinebeschichteten Zellkulturschalen ausplattiert und serumfrei in einem neuronalem Medium kultiviert. Durch die Präparation des hängenden Tropfens (*Hanging drop*-Methode) erfolgte die Differenzierung zu Kardiomyocyten [108-110]. Die undifferenzierten und differenzierten mES in unterschiedlichen Stadien wurden von der Arbeitsgruppe A. Seiler zur Verfügung gestellt

und daraus die total-RNA isoliert. Weiterhin wurde cDNA synthetisiert und für die qRT-PCR-Analysen verwendet.

Die Entwicklung neuronaler Zellen aus mES kann sowohl anhand von zelltypspezifischen Transkripten als auch durch elektrophysiologische Eigenschaften nachgewiesen werden [111-113]. Die Ergebnisse der qRT-PCR zeigten eine Zunahme der PRG1-Expression im Verlauf der Differenzierung der mES zu Neuronen (Abbildung 14). Bereits nach 14 Tagen induzierter Differenzierung zu Neuronen war die PRG1-Expression um das 100-fache im Vergleich zu undifferenzierten Zellen erhöht. Nach längerer Differenzierung nahm die PRG1-Expression noch weiter zu und zeigte eine 1000-fache Erhöhung der mRNA-Menge im Vergleich zu Kontrolle. Als Bestätigung, dass es sich bei den differenzierten Zellen tatsächlich um Neurone handelt, wurden zusätzliche Expressionsanalysen mit neuronalem Tuj1 durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Tuj1-Expression mit der zunehmenden Differenzierung der embryonalen Stammzellen hin zu Neuronen zunimmt. Herzmuskelzellen, die durch rhythmische Kontraktionen unter dem Mikroskop detektiert werden können [107, 114] exprimieren bereits nach 10 Tagen Herzmuskelproteine wie α -Aktinin und kardiales α -Aktin sowie spezifische Ionenkanäle [115, 116]. Im Gegensatz zu differenzierten Neuronen zeigten die differenzierten Kardiomyocyten, welche als Negativkontrolle eingesetzt wurden, kaum nachweisbare mRNA-Transkripte für PRG1.

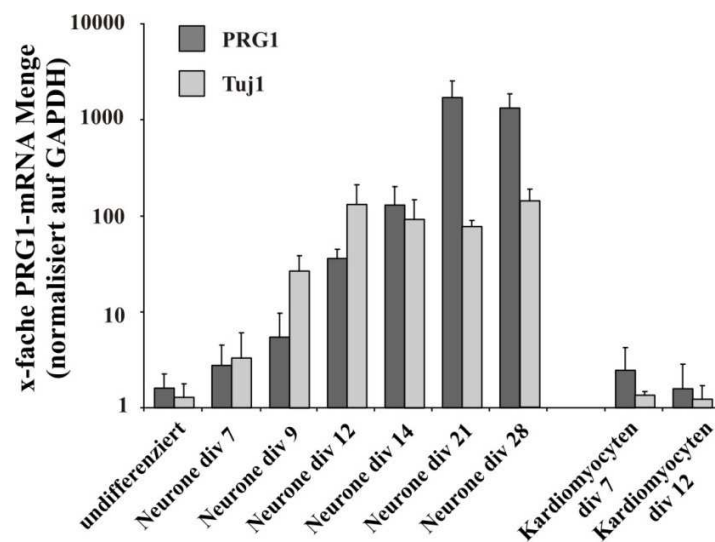


Abbildung 14: Relative PRG1-Expression in murinen embryonalen Stammzellen in differenzierten bzw. undifferenzierten Neuronen und Kardiomyocyten.

Aus der Maus-Stammzelllinie D3 wurde total-RNA isoliert und cDNA synthetisiert. Für die Anwendung wurden undifferenzierte sowie zu Neuronen und Kardiomyocyten differenzierte mES in unterschiedlichen Stadien eingesetzt

(div = *days in vitro*). Aus allen erhaltenen Ct-Werten wurde das Expressionsverhältnis von PRG1 bzw. Tuj1 zwischen undifferenzierten Stammzellen und Neuronen bzw. Kardiomyozyten gebildet. Als Normalisierung diente das *Housekeeping Gene* GAPDH. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD von n = 3 Experimenten.

Insgesamt wurde gezeigt, dass die höchste Expression von PRG1-mRNA und -Protein in verschiedenen Hirnarealen um die postnatalen Stadien P5 bis P15 stattfindet. Der Einsatz von murinen embryonalen Stammzellen stellte dabei ein Modell für entsprechende *in vivo* Entwicklungsprozesse des ZNS und der Kardiogenese dar. Die Expression der PRG1-mRNA stieg mit dem Differenzierungsgrad der mES. Dies bestätigt erneut, dass PRG1 vor allem in späten Entwicklungsstadien eine zentrale Rolle spielen muss und die Proteinexpression im Laufe der Entwicklung zunimmt. Die Kardiomyocyten sowie undifferenzierte mES zeigten eine vernachlässigbar geringe Expression von PRG1 in den getesteten Stadien, was erneut unterstreicht, dass PRG1 spezifisch und ausschließlich in Neuronen exprimiert wird.

4.2 Zelluläre Lokalisationsanalysen

4.2.1 Lokalisationsstudien von PRG1 in primären hippocampalen Neuronen

Die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse zeigten zum ersten Mal auf Proteinebene, dass PRG1 nicht nur spezifisch im Gehirn, sondern spezifisch in Neuronen exprimiert wird. Die in Zusammenarbeit entstandenen und mittlerweile von Trimbuch *et al.* publizierten Daten wiesen immunhistochemisch ebenfalls eine spezifische Lokalisation von PRG1 in Neuronen auf, was zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Daten noch nicht bekannt war [77]. Diese Erkenntnis lieferte bereits wichtige Hinweise im Hinblick auf die Funktion des Proteins. Um die Lokalisation von PRG1 subzellulär noch weiter einzugrenzen, erwiesen sich immuncytochemische Untersuchungen als notwendig. Für diese Fragestellung haben sich hippocampale Neurone aus Mausembryonen in Kultur als gutes Modellsystem bewährt. Bereits kurz nach dem Ausplattieren in geeignetem Milieu beginnen dissoziierte embryonale Neurone auszudifferenzieren. Dabei durchlaufen sie unterschiedliche Stadien, die gut charakterisiert und in zahlreichen Arbeiten beschrieben worden sind [117, 118]. Für die Analysen wurden primäre hippocampale Neurone nach 2, 4, 7 und 14 Tagen *in vitro* fixiert und endogenes PRG1 mit verschiedenen Markerproteinen für Zellstrukturen immuncytochemisch doppelgefärbt.

Um eine mögliche Kollokalisierung von endogenem PRG1 mit Cytoskelettproteinen zu untersuchen, wurden die Neurone nach 2 Tagen *in vitro* mit anti- β -Aktin und anti-Tuj1 gefärbt. Dissoziierte embryonale Hippocampus-Neurone bilden kurz nach ihrer Anheftung auf einem geeigneten Substrat motile Lamellipodien. Diese F-Aktin-reichen Strukturen kondensieren nach ungefähr 12 h zu vier bis fünf kurzen Fortsätzen. Nach 2 Tagen in Kultur entwickelt sich einer der anfangs gleichen Neuriten zum rasch auswachsenden Axon. Die Länge der anderen Neuriten bleibt dabei unverändert [118, 119]. Die überwiegende Anzahl der Neurone besaß nach 2 Tagen in Kultur einen solchen langen Ausläufer und mehrere kürzere Neuriten, die Tuj1-positiv waren. Die Übersichtsaufnahme eines Neurons, das 2 Tage kultiviert wurde, zeigt eine gleichmäßige Verteilung des endogenen PRG1 in der Plasmamembran (Abbildung 15 A). Auch in den Somata konnte ein Signal für PRG1 detektiert werden. Die vergrößerte Aufnahme eines Wachstumskegels zeigt das endogene PRG1 in der peripheren, aktinreichen und zentralen Region, in der überwiegend Mikrotubuli lokalisiert sind. Das β -Aktin war in Lamellipodien und Filopodien des Wachstumskegels der Neurone lokalisiert. Das endogene PRG1 wurde ebenfalls in diesen Strukturen gepunktet detektiert und zeigte Kollokalisierung mit dem β -Aktin-Signal (Abbildung 15 B).

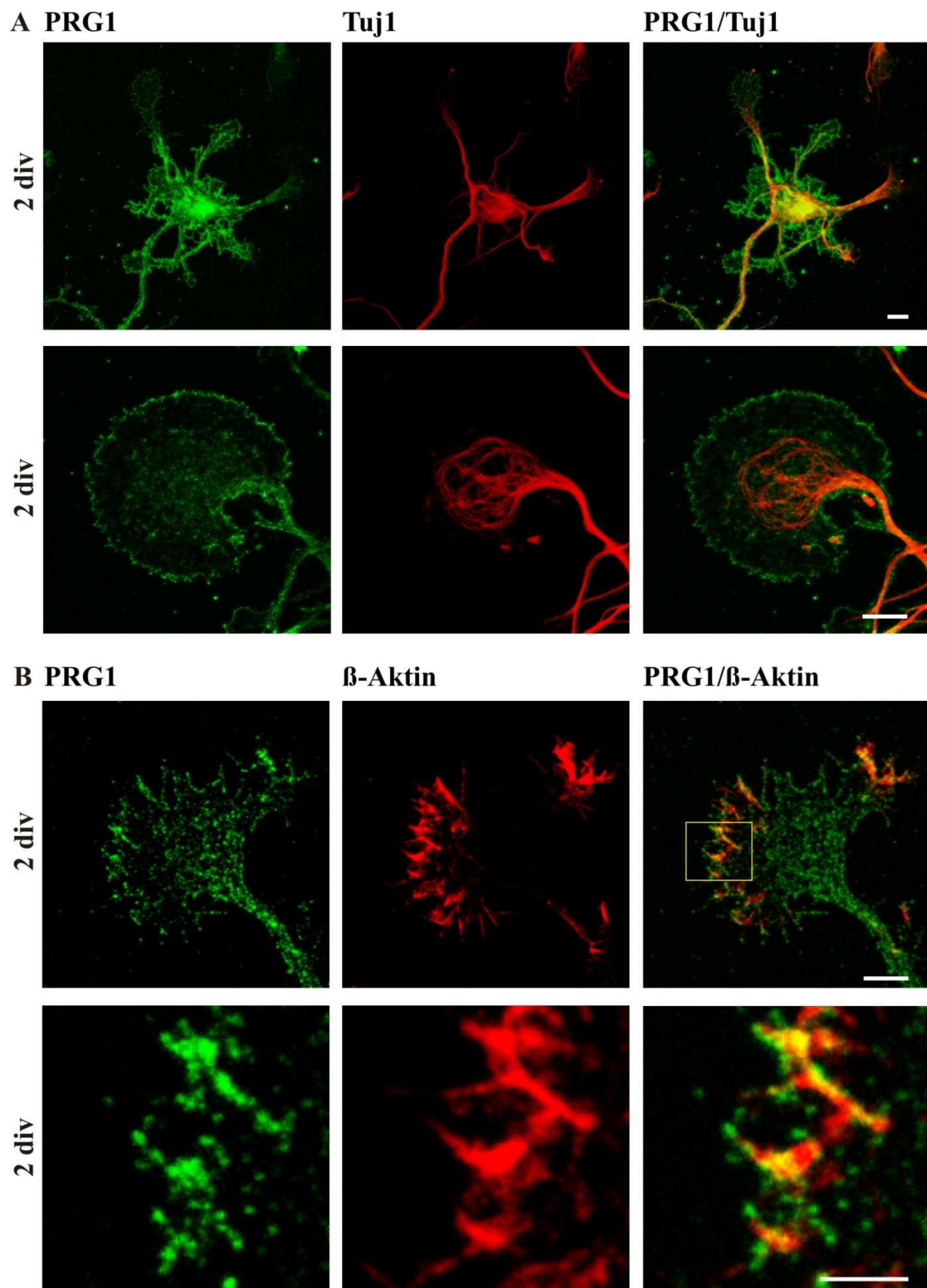


Abbildung 15: PRG1 ist in der Plasmamembran der hippocampalen Neurone nach 2 Tagen *in vitro* lokalisiert.

Immuncytochemische Untersuchungen wurden an 2 Tage kultivierten (2 div) primären hippocampalen Neuronen durchgeführt. **A** Endogenes PRG1 wurde mit einem anti-PRG1 detektiert und mit anti-Tuj1 doppelgefärbt. Oben: Übersichtsaufnahme eines Neurons, unten: Vergrößerung eines Wachstumskegels. Balken 5 μm . **B** Immuncytochemische Färbung mittels anti-PRG1 und anti- β -Aktin. Oben: Repräsentative Darstellung eines Wachstumskegels, unten: Vergrößerung des markierten Bereichs. Balken oben 5 μm und unten 2,5 μm .

In Abbildung 16 sind Neurone dargestellt, welche 4 Tage kultiviert wurden. Eine Übersichtsaufnahme des endogenen PRG1 in einem Neuron dieses Stadiums ist in Abbildung 16 A gezeigt. Nach 4 Tagen *in vitro* differenzieren die Ausläufer der primären hippocampalen Neurone zu Axonen und Dendriten und können mit spezifischen Markerproteinen detektiert werden. Um zu untersuchen, ob PRG1 in Axonen und/oder Dendriten lokalisiert ist, wurde das endogene PRG1 jeweils in Kombination mit entsprechenden Markeproteinen doppelgefärbt. Für den Nachweis von Axonen wurde das Axon-spezifische Markerprotein Tau1 und für Dendriten das Dendriten-spezifische Mikrotubuli-assoziierte Protein 2 (MAP2) gewählt.

Die Analyse zeigte eine Lokalisation des endogenen PRG1 im Zellkörper und in der Plasmamembran der primären hippocampalen Neuronen. Darüber hinaus konnte eine Lokalisation von sowohl MAP2- als auch Tau1-positiven Wachstumskegeln (Abbildung 16 B und C) in der Zellmembran nachgewiesen werden.

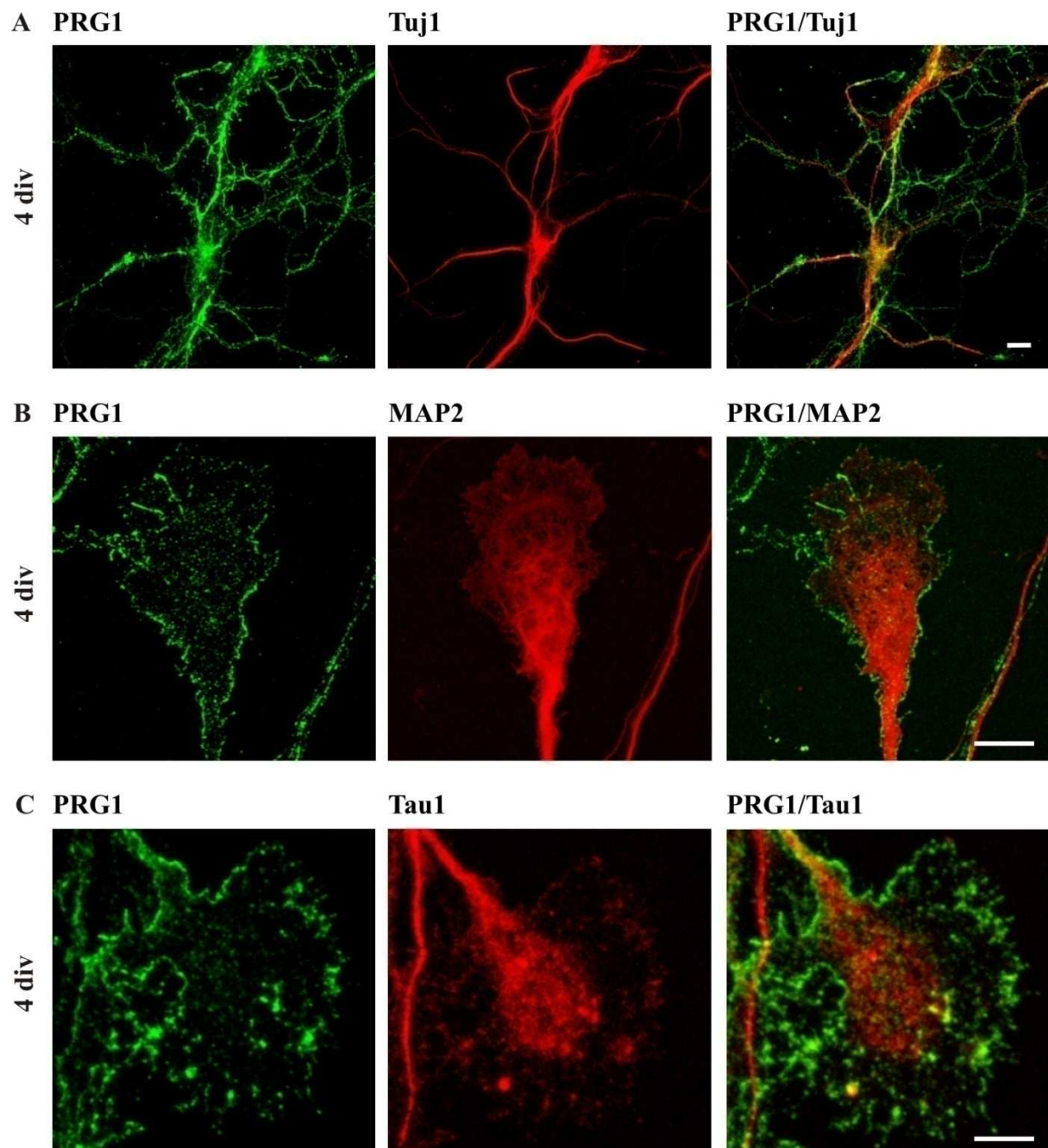


Abbildung 16: PRG1 ist in axonalen und dendritischen Wachstumskegeln nach 4 Tagen *in vitro* lokalisiert.

Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen hippocampaler Neurone nach 4 Tagen in Kultur (4 div). **A:** Übersichtsaufnahmen einer immunocytochemischen Färbung von endogenem PRG1 und Tuj1. Das endogene PRG1 ist in der Zellmembran der sowohl MAP2-positiven **B** als auch Tau1-positiven **C** Wachstumskegel der hippocampalen Neurone vorhanden. Balken 10 µm.

Nach den Untersuchungen in jungen Neuronen *in vitro* wurde eine Lokalisation von PRG1 in der Plasmamembran der neuronalen Fortsätze und in axonalen sowie dendritischen

Wachstumskegeln nachgewiesen. Weiterhin sollte die subzelluläre Verteilung des endogenen PRG1 in Neuronen nach 7 und nach 14 Tagen in Kultur analysiert werden. Nach 7 Tagen in Kultur fangen die Neurone an, synaptische Kontakte über dendritische Spines und axonale Terminalien auszubilden, und somit das neuronale Netz zu verstärken. Nach 14 Tagen in Kultur sind die Zellen vollständig ausgereift und stark polarisiert. In diesem Stadium können Axone und Dendriten bis zu einer Länge von mehreren Millimetern auswachsen. Die Dendriten verzweigen sich und die Axone bilden Kollaterale und funktionelle synaptische Kontakte [25, 119, 120].

Die Abbildung 17 zeigt die Aufnahmen der immunocytochemischen Färbungen von 7 Tage kultivierten Neuronen. Das endogene PRG1 war im Zellkörper und in neuronalen Fortsätzen vorhanden (Abbildung 17 A). Um die Lokalisation in Axonen und Dendriten zu überprüfen, wurde mit anti-PRG1 und anti-MAP2 bzw. anti-Tau1 doppelgefärbt. Die Verteilung des PRG1-Proteins in primären hippocampalen Neuronen nach 7 Tagen *in vitro* zeigte ein starkes Signal in MAP2-positiven Dendriten. In den Tau1-positiven Axonen konnte das endogene PRG1 ebenfalls detektiert werden. Das Signal hier war jedoch schwächer als in den dendritischen Fortsätzen.

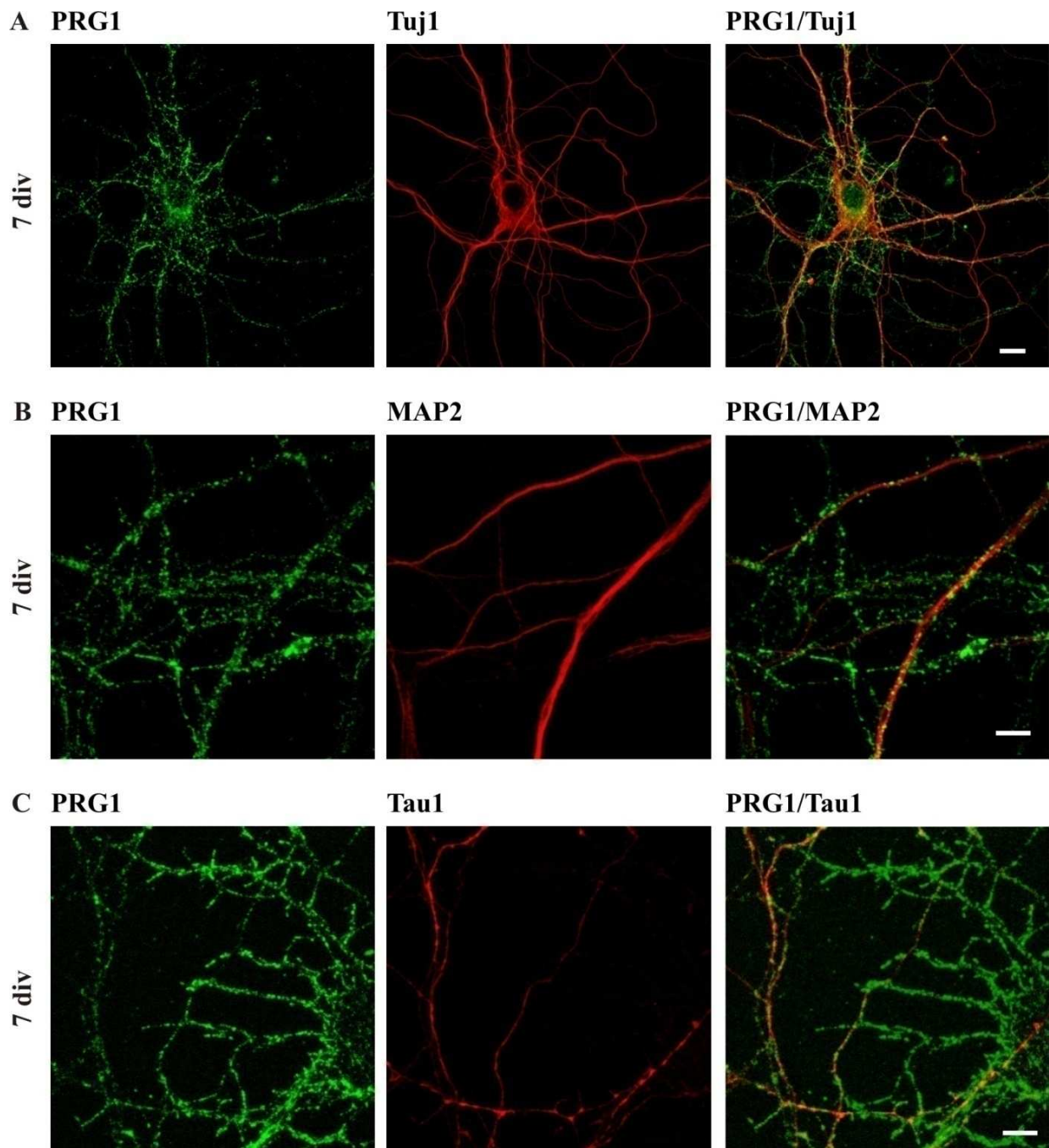


Abbildung 17: PRG1-Lokalisation in hippocampalen Neuronen nach 7 Tagen *in vitro*.

A: Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahme eines Neurons gefärbt mit anti-PRG1 und anti-Tuj1 nach 7 Tagen in Kultur. Endogenes PRG1 wurde in MAP2-positiven Dendriten **B** und in Tau1-positiven Axonen **C** in primären hippocampalen Neuronen nach 7 Tagen *in vitro* nachgewiesen. Balken = 10µm.

Nachdem gezeigt wurde, dass PRG1 in Neuronen nach 7 Tagen in Kultur in Dendriten eine stärkere Lokalisation als in Axonen zeigte, sollte in reifen, 14 Tage kultivierten Neuronen die

PRG1-Lokalisation analysiert werden. Die Ergebnisse zeigen, dass das endogene PRG1 stark in den Dendriten und kaum noch in den Axonen detektiert werden konnte (Abbildung 18 A und B). Eine besonders starke PRG1-Lokalisation konnte in den dendritischen Dornfortsätzen, den sogenannten Spines, nachgewiesen werden. Bei den Spines handelt es sich um kleine Membranausstülpungen der Dendriten. Solche Spines beinhalten sowohl Rezeptoren zur Erkennung der Neurotransmitter als auch Möglichkeiten zum Weiterleiten der Signale [118]. Eine Lokalisation von PRG1 in solchen Strukturen gibt Hinweise darauf, dass PRG1 möglicherweise an der neuronalen Transmission beteiligt sein könnte.

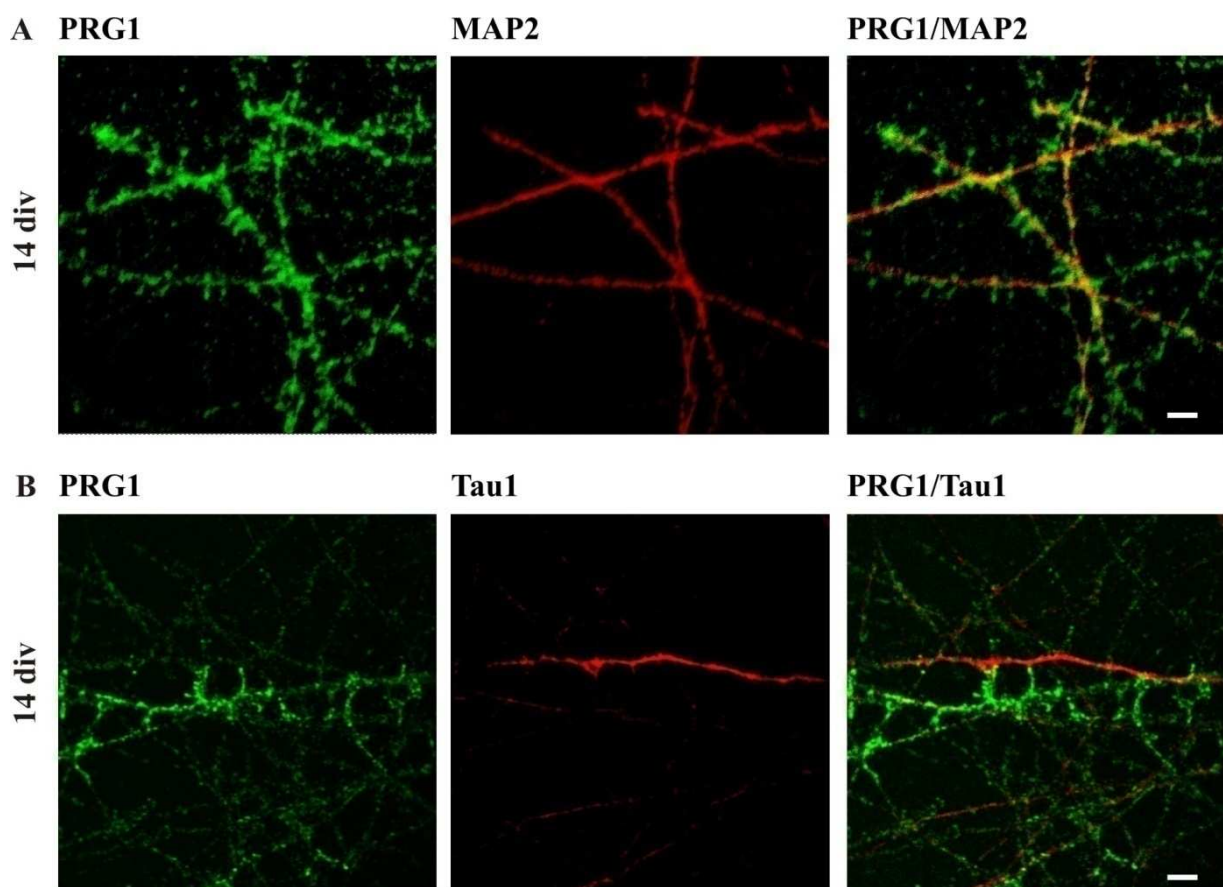


Abbildung 18: PRG1 ist in den Dendriten und Spines der hippocampalen Neuronen nach 14 Tagen *in vitro* lokalisiert.

Immunocytochemische Untersuchungen des endogenen PRG1 in primären hippocampalen Neuronen nach 14 Tagen *in vitro*. Endogenes PRG1 wurde in MAP2-positiven Dendriten **A** und kaum in Tau1-positiven Axonen **B** in primären hippocampalen Neuronen nach 14 Tagen *in vitro* nachgewiesen. Balken = 10 µm.

4.2.2 PRG1 ist postsynaptisch lokalisiert

Die ersten Untersuchungen des endogenen PRG1 in primären hippocampalen Neuronen nach 14 Tagen in Kultur, zeigten ein starkes Signal in der Plasmamembran der Dendriten und dendritischen Ausstülpungen (Spines). Diese intrazelluläre Verteilung von PRG1 in reifen Neuronen könnte auf seine Lokalisation in postsynaptischen Endigungen hindeuten. Die im Zeitrahmen dieser Untersuchung noch nicht bekannten Ergebnisse wurden mittlerweile von Trimbuch *et al.* publiziert und zeigten ebenfalls eine postsynaptische Lokalisation von PRG1 [77].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden immunocytochemische Färbungen mit anti-PSD-95 (*post synaptic density-95*) und anti-VAMP2 (*vesicle associated membrane protein*) durchgeführt, um die Lokalisation von PRG1 in Synapsen zu überprüfen. Bei der Färbung von PRG1 in Kombination mit anti-PSD-95 konnte teilweise eine Kolo­kalisierung mit der postsynaptischen Dichte festgestellt werden. Das endogene PRG1 war punktförmig um das Signal der postsynaptischen Dichte nachweisbar (Abbildung 19 A). Das VAMP2 ist ein integrales Membranprotein der synaptischen sekretorischen Vesikel und ist demnach in präsynaptischen Terminalien lokalisiert. Endogenes PRG1 war in dieser Doppelfärbung nicht mit VAMP2 kolo­kalisiert, was eine präsynaptische Lokalisation weitgehend ausschließen lässt (Abbildung 19 B).

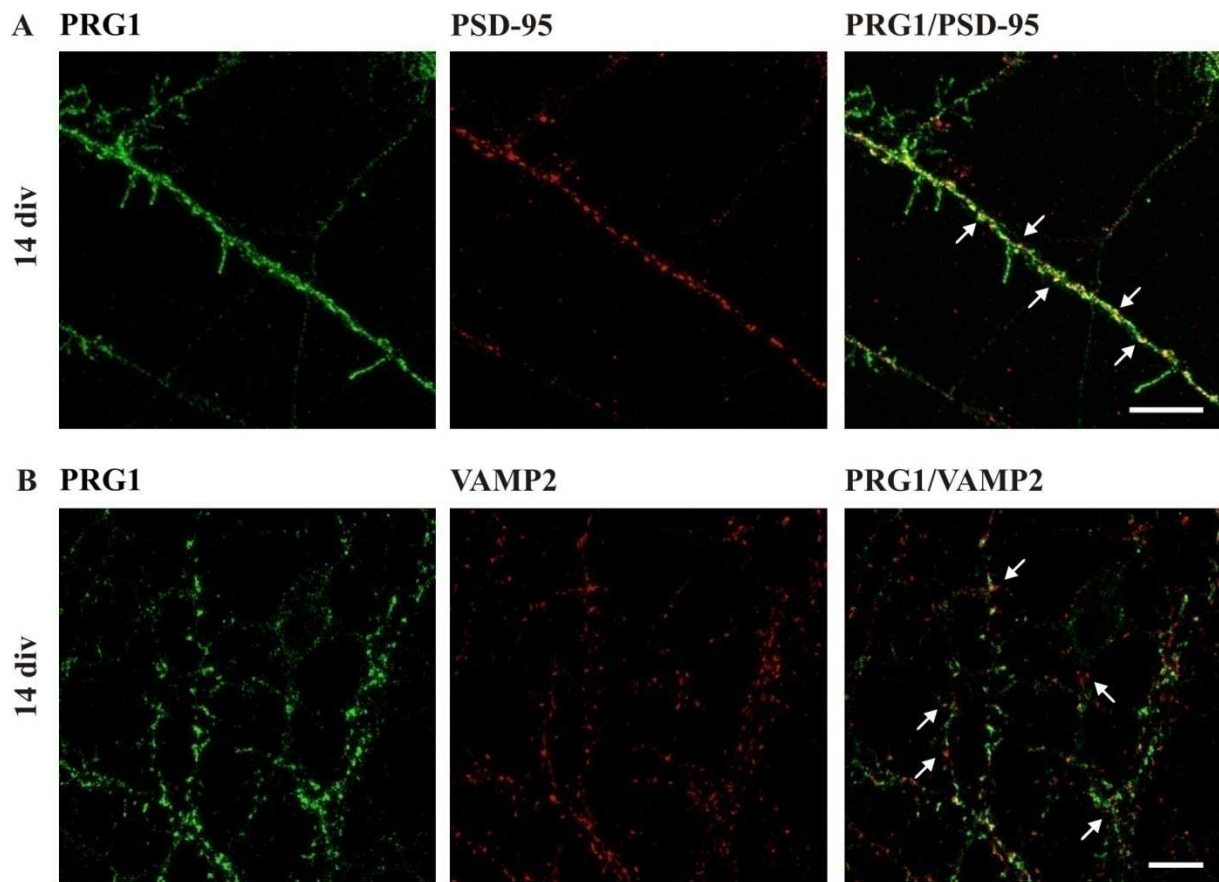


Abbildung 19: PRG1 ist in den postsynaptischen Terminalien lokalisiert.

Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen reifer hippocampaler Neurone. Immuncytochemische Untersuchungen wurden an Neuronen, welche 14 Tage kultiviert wurden (14 div), durchgeführt. Endogenes PRG1 wurde mit anti-PRG1 und mit anti-PSD-95 **A** bzw. anti-VAMP2 **B** doppelgefärbt. Pfeile markieren beispielhafte Stellen, an denen PRG1 mit gefärbten Markerproteinen kolokalisiert oder nicht kolokalisiert war. Balken beträgt 10 µm.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass PRG1 in jungen unreifen Neuronen *in vitro* gleichmäßig in der Plasmamembran der gesamten Zellen vorhanden ist. Im Verlauf der Zelldifferenzierung findet eine Polarisierung der PRG1-Lokalisation statt. Die Menge des Proteins nimmt dann in den Axonen ab, während sie in den Dendriten und besonders in dendritischen Spines zunimmt. In reifen Neuronen konnte eine Lokalisation darüber hinaus in postsynaptischen Strukturen beobachtet werden.

4.3 Expressionsanalysen der LPA-Rezeptoren während der Gehirnentwicklung der Maus

Jüngste Arbeiten zeigen, dass primäre Neurone, isoliert aus einer PRG1-KO-Maus, eine geringere Fähigkeit zur Aufnahme eines fluoreszierenden Phosphatidats besitzen. Die Generierung einer PRG1/LPA2 Doppel-KO-Maus zeigte, dass der PRG1-Phänotyp kompensiert werden konnte. Die Mäuse entwickelten sich normal und bekamen keine spontanen konvulsiven Anfälle. Darüber hinaus wurde postuliert, dass PRG1 durch Interaktion mit anderen Proteinen und LPA als Bindeglied die Transmitterfreisetzung auf der Präsynapse regulieren kann [77]. Die Gesamtheit dieser Daten ist ein Indiz dafür, dass PRG1 durch Interaktion mit Phospholipiden im synaptischen Spalt in die Signaltransduktion an der postsynaptischen Seite eingreifen könnte.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, welchen Einfluss LPA auf primäre Neurone in Kultur ausübt und ob LPA an der neuronalen Transmission beteiligt ist. Dafür sollten zunächst Expressionsanalysen durchgeführt werden, um die an diesem Prozess beteiligten LPA-Rezeptoren möglichst einzugrenzen.

Bislang sind fünf G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bekannt, welche LPA als Ligand spezifisch binden können [53, 54, 121]. Kürzlich wurden in der Fachliteratur zwei weitere Rezeptoren beschrieben, die unter anderem LPA als Agonisten besitzen [56, 122]. Jedoch ist bisher noch nicht abschließend geklärt, ob diese Rezeptoren zu der LPA-Rezeptoren-Familie gehören [123]. Aus diesem Grund wurden diese beiden Rezeptoren im Rahmen dieser Arbeit außer Acht gelassen. Es gibt mehrere Hinweise darauf, dass LPA-Rezeptoren im ZNS exprimiert werden und LPA auch im Gehirn vorkommt [4, 124, 125]. Nach der Entdeckung der ersten LPA-Rezeptoren wurde die Expression mittels Northern Blot und weiterhin durch *in situ*-Hybridisierung analysiert. Andere Gruppen haben die Expression mittels reverse Transkriptase-PCR untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression der mRNA-Transkripte aller bekannten LPA-Rezeptoren im ZNS während der Entwicklung mittels der modernen und sensitiven Methode der quantitativen Real-Time-PCR detailliert analysiert.

Dafür wurde total-RNA aus verschiedenen Hirnregionen wie Hippocampus, Neocortex, Cerebellum und Bulbus olfactorius der Maus während der Entwicklung vom embryonalen Tag 14 (E14) bis zum postnatalen Tag 30 (P30) isoliert. Die daraus synthetisierte cDNA wurde für die anschließenden Untersuchungen eingesetzt. Hippocampus und Bulbus olfaktorius sind am emb-

ryonalen Tag 14 noch nicht ausgebildet. Aus diesem Grund wurden hier die Analysen ab dem E16-Stadium durchgeführt.

Abbildung 20 gibt die Ergebnisse dieser Untersuchungen graphisch wieder. Insgesamt konnte für den LPA1-Rezeptor eine Expression in allen getesteten Hirnarealen gezeigt werden. Im Hippocampus und Neocortex ist die Expression ungefähr gleich stark und bleibt im Zeitverlauf der Entwicklung relativ stabil. Im Cerebellum kommt es kurz nach der Geburt zu einer Zunahme der Menge an mRNA-Transkripten für LPA1. Im Bulbus olfactorius zeigte das Stadium E19 die höchste Expression der mRNA-Niveaus. Im Hippocampus war die Expression des LPA2-Rezeptors nahezu identisch zu der des LPA1-Rezeptors. Im Neocortex, Cerebellum und Bulbus olfactorius konnte im Zeitverlauf der neuronalen Entwicklung eine Abnahme der Expressionsstärke in postnatalem Gewebe beobachtet werden. Der LPA4-Rezeptor war ebenfalls in allen untersuchten Arealen präsent. Seine Expression nahm in postnatalen Stadien des ZNS ab. Für die LPA3- und LPA5-Rezeptoren konnte keine Expression der mRNA in den getesteten Hirnarealen nachgewiesen werden.

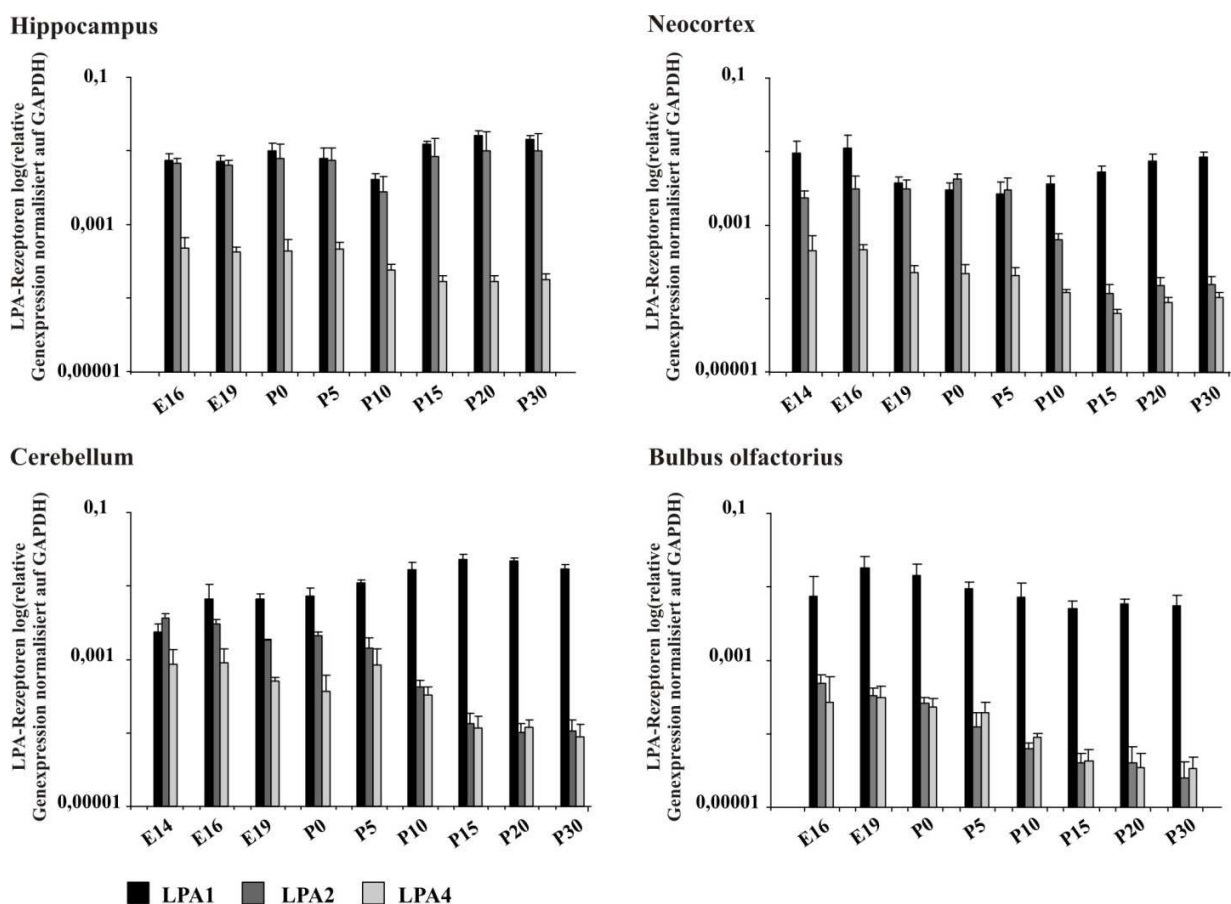


Abbildung 20: Expression der LPA-Rezeptoren im ZNS der Maus während der Gehirnentwicklung.

Quantitative-RT-PCR-Analysen der Expression von LPA-Rezeptoren im Hippocampus, Neocortex, Cerebellum und Bulbus olfactorius während der Gehirnentwicklung. Die mRNA-Expression in unterschiedlichen Regionen wurde von E14 bzw. E16 bis P30 untersucht. Für jede Analyse wurde das Gewebe aus mindestens drei Mäusen isoliert und vereint. Die mRNA für LPA1, 2 und 4 konnte in allen untersuchten Hirnregionen und Entwicklungsstadien nachgewiesen werden. Die Niveaus der LPA3- und 5-mRNA waren nicht nachweisbar. Zur Normalisierung der Ergebnisse diente GAPDH. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD für n = 3 Experimente.

4.4 Lokalisation und Expression der LPA-Rezeptoren in primären hippocampalen**Neuronen**

In weiteren Untersuchungen sollte die subzelluläre Lokalisation der LPA-Rezeptoren in primären hippocampalen Neuronen nach 2, 4 und 14 Tagen *in vitro* analysiert werden. Dafür wurde zuerst mittels qRT-PCR überprüft, welche Rezeptoren zu diesen Zeitpunkten in primären hippocampalen Neuronen *in vitro* exprimiert werden. Zur Validierung der Analysen wurden vier verschiedene *Housekeeping Gene* getestet (GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, eIF1A: Translationsinitiation Faktor 1a, Pfkfb3: Phosphoglycerat Kinase 1 und HPRT: Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase), bevor dasjenige ausgewählt wurde, welches in den zu analysierenden Proben nicht reguliert war. Als Referenzgen wurde hier aus Gründen der geringeren Regulation während der neuronalen Differenzierung Pfkfb3 eingesetzt. Allerdings war sogar Pfkfb3 in kultivierten Neuronen zu unterschiedlichen Differenzierungsstadien so reguliert, dass nur ein Vergleich der mRNA-Niveaus von LPA-Rezeptoren innerhalb eines Stadiums und nicht in verschiedenen Stadien untereinander möglich war. Es wurde in primärer Zellkultur beobachtet, dass eine Kontamination mit Gliazellen bestehen könnte. Solch eine Kontamination würde die Ergebnisse der qRT-PCR verfälschen. Um dies zu vermeiden, wurde der frisch ausplattierten Neuronenkultur ein Proliferationshemmer (Cytosin-Arabinosid, 1 μ M) zugesetzt, der das Wachstum der Gliazellen inhibierte.

Die Ergebnisse der qRT-PCR aus 2 Tage kultivierten hippocampalen Neuronen sind in Abbildung 21 A gezeigt. Eine starke Expression wurde für die LPA1- und LPA2-Rezeptoren detektiert. Im Vergleich dazu war die Expression des LPA4-Rezeptors relativ gering und LPA3- und LPA5-mRNA-Transkripte konnten nicht detektiert werden. Aus diesem Grund wurden die Rezeptoren LPA3 und LPA5 von immunocytochemischen Analysen ausgeschlossen. Die immunocytochemische Färbungen des LPA4-Rezeptors waren aufgrund unzureichender Spezifität der

kommerziell erhältlichen Antikörper nicht möglich (Daten nicht gezeigt). Nur die intrazelluläre Verteilung der LPA1- und LPA2-Rezeptoren in primären Neuronen *in vitro* wurde untersucht.

Bevor die immunocytochemischen Analysen beginnen konnten, wurde die Spezifität der verwendeten Antikörper überprüft. Mit dem LPA1-Antikörper konnte im Wildtyp-Gewebe eine Doppelbande auf der Höhe von ~ 41 kDa detektiert werden. Der LPA2-Antikörper zeigte eine starke Bande bei ungefähr 39 kDa (Abbildung 21). Im Gegensatz dazu zeigten die verwendeten Antikörper keine Banden im als Kontrolle verwendeten entsprechenden KO-Gewebe.

Die Resultate der immunocytochemischen Untersuchungen der primären Neurone nach 2 Tagen in Kultur sind in Abbildung 21 C und D wiedergegeben. Sowohl der endogene LPA1- als auch der endogene LPA2-Rezeptor wurden in den Wachstumskegeln der Neuriten detektiert. Beide Rezeptoren wurden in Form eines gepunkteten Signals nachgewiesen. Das Cytoskelett der aktinreichen Strukturen wie Filopodien und Lamellipodien wurde mit anti- β -Aktin dargestellt. Der LPA1-Rezeptor zeigte teilweise Kolo-kalisation mit solchen Strukturen und war im peripheren Bereich aktinreicher Filopodien und Lamellipodien lokalisiert. Darüber hinaus war der endogene LPA1-Rezeptor in zentraler Region des Wachstumskegels nachweisbar. Der LPA2-Rezeptor war stark in den Neuriten und β -Aktin-freien, zentralen Regionen des Wachstumskegels vorhanden.

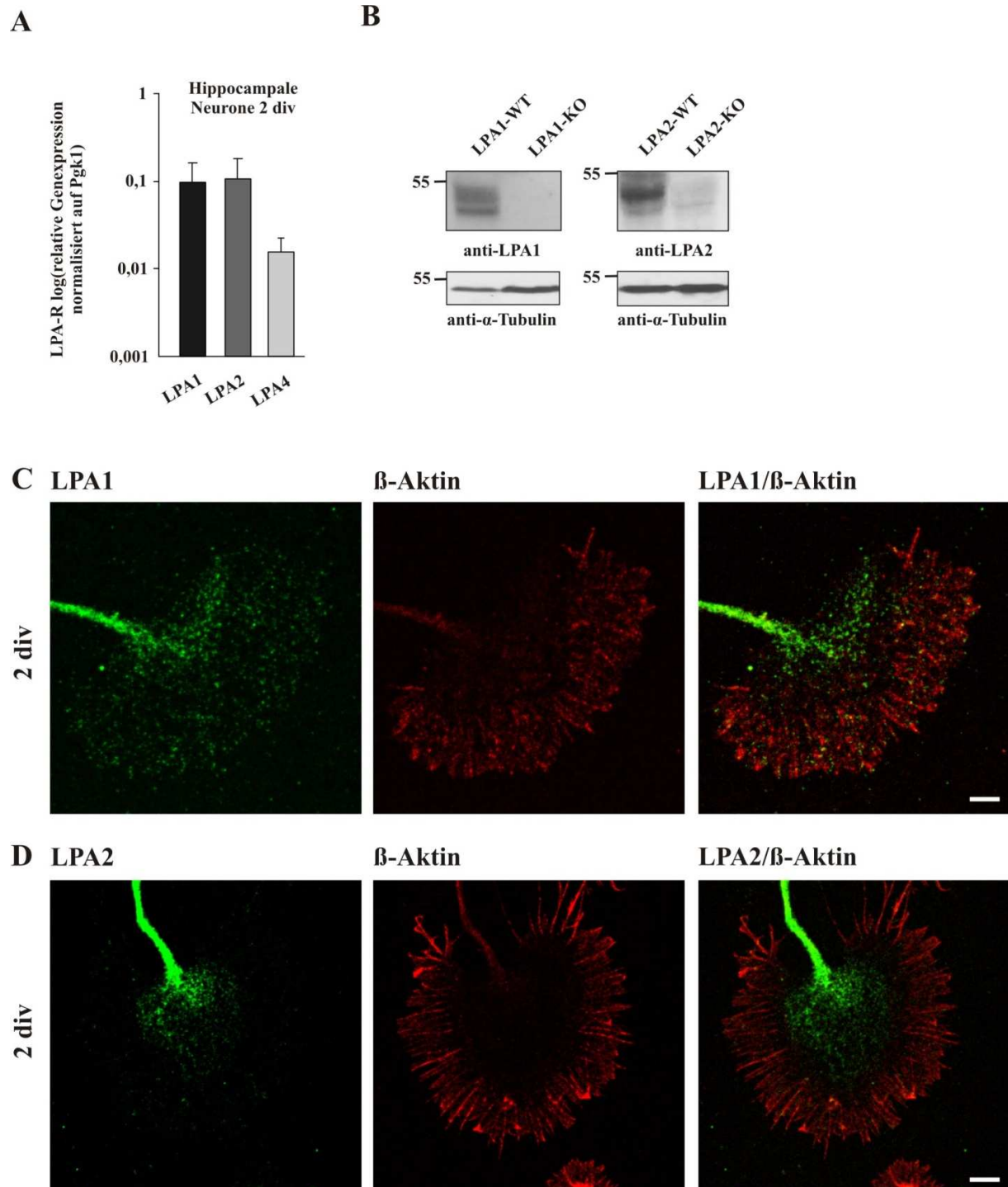


Abbildung 21: Nachweis der LPA-Rezeptoren in primären hippocampalen Neuronen nach 2 Tagen *in vitro*.

A: Quantitative Real-Time-PCR-Analysen der Expression von LPA-Rezeptoren in hippocampalen Neuronen, 2 Tage *in vitro* (2 div). Nachgewiesen wurde nur die mRNA-Expression der Rezeptoren LPA1, 2 und 4. Die mRNA-Transkripte für die Rezeptoren LPA3 und LPA5 wurden nicht detektiert. Als Referenzgen wurde Pgk1 verwendet. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD für $n = 3$ Experimente. **B:** Repräsentative Spezifitätsanalysen der LPA1- und LPA2-Antikörper im Immunblot. Für die Analysen wurde das Proteinlysate aus einer Wildtyp-Maus (WT) sowie aus einer

LPA1-KO oder LPA2-KO verwendet. Die Ladekontrolle erfolgte mit einem anti- α -Tubulin. Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen hippocampaler Neurone, welche nach 2 Tagen *in vitro* fixiert und immunocytochemisch mit anti-LPA1 **C** oder anti-LPA2 **D** in Kombination mit anti- β -Aktin gefärbt wurden. LPA1- und LPA2-Signal wurde in Wachstumskegeln der Neurone detektiert. Balken beträgt 5 μ m.

Des Weiteren wurden Untersuchungen in primären hippocampalen Neuronen nach 4 Tagen in Kultur durchgeführt. Mittels qRT-PCR wurde überprüft, welche LPA-Rezeptoren in kultivierten Neuronen in diesem Differenzierungsstadium exprimiert werden. Die Ergebnisse zeigten ein gleiches Expressionsniveau für LPA1- und LPA2-Rezeptoren in diesen Proben (Abbildung 22 A). Die mRNA-Expression des LPA4-Rezeptors war um das 8-fache schwächer als die des LPA1- oder 2-Rezeptors, die der LPA3- und LPA5-Rezeptoren war nicht nachweisbar. Immunocytochemisch wurde die subzelluläre Lokalisation wie schon in 2 Tage kultivierten Neuronen nur für die LPA1- und LPA2-Rezeptoren untersucht.

Das neuronale Tubulincytoskelett wurde mit anti-Tuj1 dargestellt. Wie in den Übersichtsaufnahmen ersichtlich, waren beide Rezeptoren im Zellkörper und in neuronalen Fortsätzen vorhanden. Der endogene LPA1-Rezeptor zeigte ein starkes Signal im Wachstumskegel und war sowohl im peripheren Bereich als auch in dessen zentraler Region nachweisbar (Abbildung 22 B). Das Signal für den LPA1-Rezeptor war mit dem von Tuj1 kolokalisiert. In 4 Tage kultivierten hippocampalen Neuronen *in vitro* war der endogene LPA1-Rezeptor, wie schon in 2 Tage kultivierten Neuronen in Filopodien und Lamellipodien vorhanden. Der endogene LPA2-Rezeptor zeigte ein schwaches, gepunktetes Signal im Wachstumskegel. In diesem Stadium konnte der LPA2-Rezeptor überwiegend im Zellkörper und Fortsätzen der hippocampalen Neuronen *in vitro* nachgewiesen werden (Abbildung 22 C).

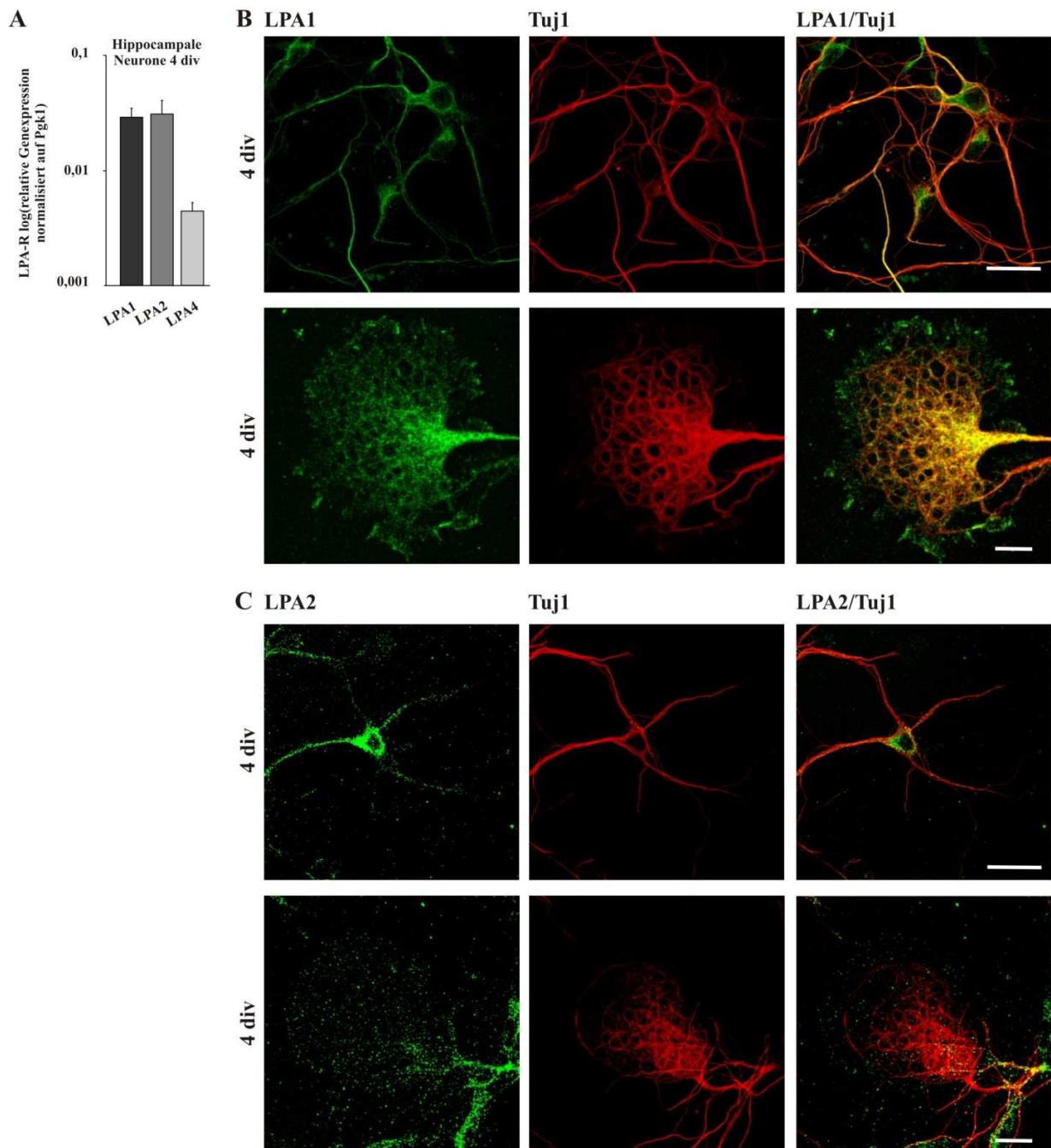


Abbildung 22: Expression und Lokalisation der LPA-Rezeptoren in primären hippocampalen Neuronen nach 4 Tagen in Kultur.

A: Quantitative RT-PCR-Analysen der mRNA-Expression für LPA-Rezeptoren in primären hippocampalen Neuronen nach 4 Tagen in Kultur (4 div). Nur die Expression der LPA1-, 2- und 4-Rezeptoren wurde nachgewiesen. Die Expression der LPA3- und LPA5-mRNA-Transkripte wurde nicht detektiert. Die Messwerte wurden auf Referenzgen Pgk1 normalisiert. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD für $n = 3$ Experimente. Konfokalmikroskopische Aufnahmen primärer hippocampaler Neurone nach 4 Tagen *in vitro*. Die immunocytochemische Färbung erfolgte mit anti-LPA1 **B** oder anti-LPA2 **C** und mit anti-Tuj1 gegengefärbt. Beide Rezeptoren zeigten ein Signal in Tuj1-positiven neuronalen Fortsätzen. Balken beträgt 10 μ m.

Im Anschluss hieran wurde überprüft, ob die subzelluläre Verteilung von LPA-Rezeptoren nach 14 Tagen in Kultur identisch mit den bereits bekannten Mustern aus 2 und 4 Tage kultivierten hippocampalen Neuronen ist. Zuvor wurde die Expression der LPA-Rezeptoren in 14 Tage kultivierten Neuronen überprüft. In Abbildung 23 sind die Resultate dieser Untersuchung zusammengefasst.

Die qRT-PCR-Analysen zeigten, dass die Expression des LPA1-Rezeptors in 14 Tage kultivierten Neuronen im Vergleich zu der des LPA2-Rezeptors um das etwa 6-fache niedriger war (Abbildung 23 A). Die mRNA-Transkripte für die Rezeptoren LPA3, LPA4 und LPA5 konnten in diesem Stadium der primären hippocampalen Neuronen *in vitro* nicht detektiert werden.

In konfokalmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 23 B) ist gezeigt, dass der LPA1-Rezeptor in hippocampalen Neuronen nicht in MAP2-positiven Dendriten nachgewiesen werden konnte. Ein starkes Signal des endogenen LPA1-Rezeptors konnte in Zellen beobachtet werden, welche morphologisch den Astrozyten ähnlich waren. Das Signal des LPA2-Rezeptors war sowohl mit MAP2-positiven Dendriten als auch mit Tau1-positiven Axonen kolokalisiert (Abbildung 23 C). Darüber hinaus zeigte der endogene LPA2-Rezeptor ein starkes Signal im Zellkörper der Neurone.

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse aus immuncytochemischen Untersuchungen sollte die Expression des LPA1-Rezeptors in Astrozyten mittels qRT-PCR überprüft werden. Als Kontrolle sollte der LPA2-Rezeptor dienen, welcher immuncytochemisch in 14 Tage kultivierten Neuronen nicht in Astrozyten ähnlichen Zellen, sondern in Neuronen detektiert wurde. Wie vermutet zeigte das Ergebnis der qRT-PCR eine starke Expression des LPA1-Rezeptors in Astrozyten (Abbildung 23 D). Die mRNA der LPA2-Transkripte war ebenfalls in geringen Mengen vorhanden, jedoch war ihre Konzentration um das 12-fache geringer im Vergleich zu der des LPA1-Rezeptors.

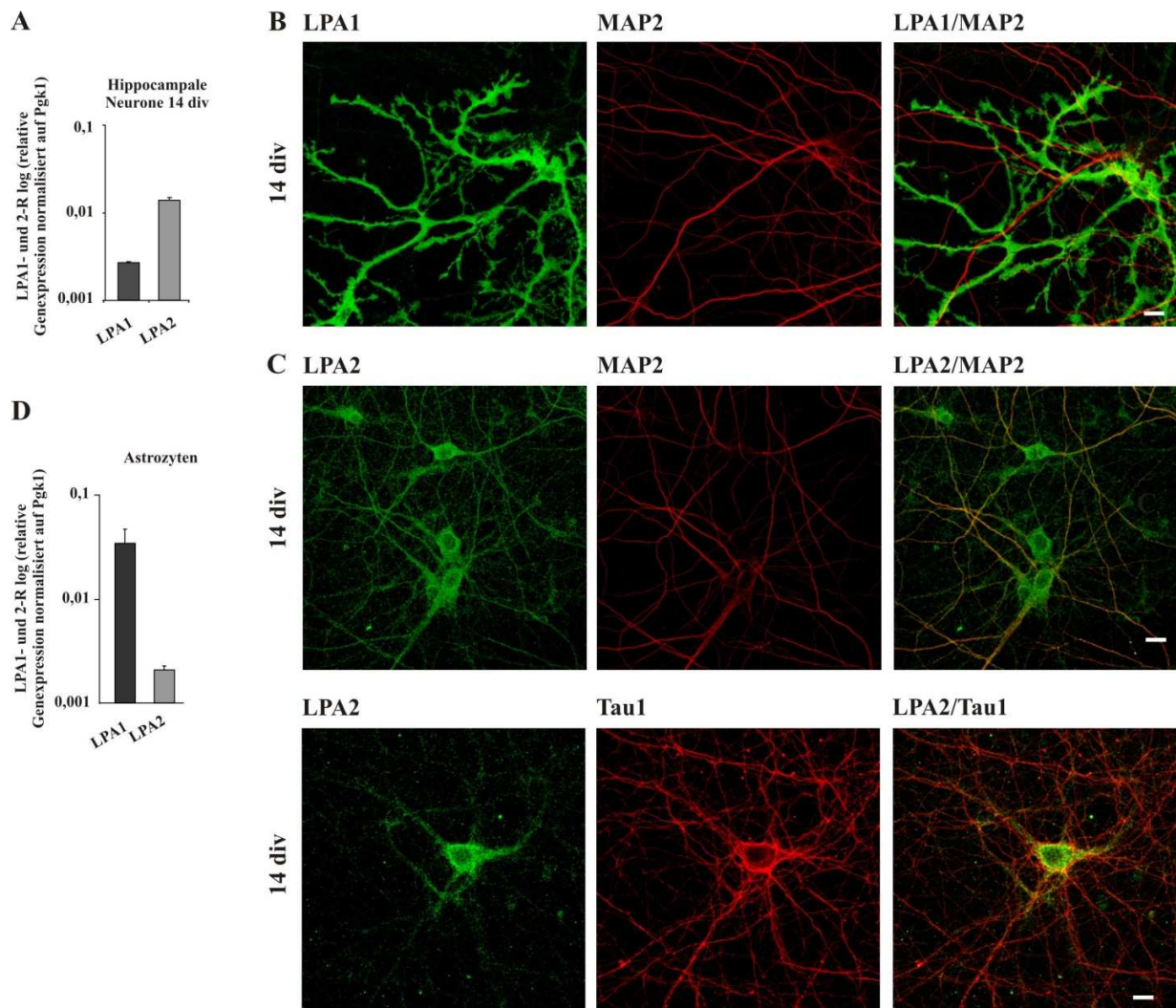


Abbildung 23: Expression und Lokalisation der LPA-Rezeptoren in primären hippocampalen Neuronen nach 14 Tagen *in vitro*.

A: Quantitative RT-PCR-Analysen der Expression von LPA-Rezeptoren in hippocampalen Neuronen nach 14 Tagen in Kultur (14 div). Nur die mRNA-Transkripte für die Rezeptoren LPA1 und LPA2, aber nicht für LPA3, 4 und 5 wurden detektiert. Als Referenzgen wurde Pgk1 eingesetzt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD für $n = 3$ Experimente. Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen primärer hippocampaler Neurone, welche nach 14 Tagen in Kultur immunocytochemisch mit anti-LPA1 und anti-MAP2 **B** oder anti-LPA2 in Kombination mit anti-MAP2 bzw. anti-Tau1 **C** gefärbt wurden. Balken beträgt $10 \mu\text{m}$ **D** Expressionsanalysen mittels qRT-PCR für LPA1- und LPA2-mRNA-Transkripte in Astrozyten. Als Referenzgen diente Pgk1. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD für $n = 3$ Experimente.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in frühen Differenzierungsstadien primärer hippocampaler Neurone (2 und 4 Tage *in vitro*) die LPA1- und LPA2-Rezeptoren eine stärkere Expression im Vergleich zum LPA4-Rezeptor aufweisen. Die mRNA-Transkripte für die LPA-Rezeptoren 3 und 5 konnten in 2 und 4 Tage kultivierten Neuronen mittels qRT-PCR nicht nach-

gewiesen werden. Die Lokalisation der LPA1- und LPA2-Rezeptoren in diesem Stadium der kultivierten Neuronen wurde im Soma und im Wachstumskegel beobachtet. LPA1 zeigte ein starkes Signal in den aktinreichen Strukturen der Lamellipodien und Filopodien des Wachstumskegels. Der LPA2-Rezeptor wies eine intensive Färbung in den Neuriten der jungen Neuronen auf. In 2 Tage kultivierten Neuronen war der LPA2-Rezeptor in der zentralen Region des Wachstumskegels lokalisiert.

In reifen, 14 Tage kultivierten Neuronen zeigten die Analysen mittels qRT-PCR, dass der LPA1-Rezeptor in primären Neuronen um das 7-fache schwächer exprimiert war als der LPA2-Rezeptor. Immunocytochemisch konnte LPA1 in Zellen nachgewiesen werden, welche morphologisch Astrozyten ähnlich waren. Die qRT-PCR-Analyse bestätigte eine Expression des LPA1-Rezeptors in Astrozyten. Der LPA2-Rezeptor war in diesem Stadium reichlich in Neuronen vorhanden und zeigte in konfokalmikroskopischen Aufnahmen eine gleichmäßige Verteilung im Zellkörper sowie in den MAP2-positiven Dendriten und Tau1-positiven Axonen. Es konnte keine Expression der LPA3-, LPA4- und LPA5-Rezeptoren in primären hippocampalen Neuronen nach 14 Tagen *in vitro* mittels qRT-PCR nachgewiesen werden.

4.5 LPA führt zum Ca^{2+} -Anstieg in hippocampalen Neuronen

Frühere Untersuchungen an diversen Zelllinien wie z. B. PC12- oder N1E-115-Zellen demonstrierten bereits, dass LPA über die Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden zur Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führt [21, 126]. Bis jetzt war jedoch nicht bekannt, ob LPA auch in primären hippocampalen Neuronen einen solchen Effekt hervorrufen kann. Durch eigene Untersuchungen mittels qRT-PCR wurde präsentiert, dass hauptsächlich LPA1- und LPA2-Rezeptoren in primären Neuronen exprimiert werden. Die Signalkaskaden beider Rezeptoren sind bereits bekannt und es entstand die Vermutung, dass LPA auch in Neuronen zu einem intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg führen könnte. Diese Annahme sollte in weiteren Untersuchungen analysiert werden.

Das intrazelluläre Calcium im Soma der hippocampalen Neurone wurde durch Anwendung von fluoreszierendem Fura-2/AM an einem inversen Fluoreszenzmikroskop gemessen. Fura-2/AM ist ein zellpermeabler Calciumindikator, der in Calcium-gebundenem Zustand eine Spektralverschiebung der Lichtemission zeigt. Diese Eigenschaft ermöglicht Ratiomessungen und semiquantitative Aussagen über den intrazellulären Calciumspiegel. Zunächst wurde der in-

trazelluläre Ruhespiegel des Calciums vor jeder Messung bestimmt, um anschließend das Ratio errechnen zu können. Das LPA wurde direkt auf die Zellen appliziert und eine Zeitkinetik aufgezeichnet. In jedem Experiment wurden mindesten zwei Deckgläschen von drei unterschiedlichen Präparationstagen der Neuronenkultur gemessen. Die Zellen wurden 6 bis 7 Tage kultiviert, bevor die Untersuchungen stattfanden. Für die Kinetik wurden Einzelzellkörper markiert und die Veränderung der Ca^{2+} -Konzentrationen im Verlauf der Messzeit mittels Fucal-Software (Till-photonics) bestimmt.

Für die folgenden Experimente sollte zuerst die LPA-Konzentration optimiert werden. Für die Erstellung der LPA-Wirkungskurve wurden unterschiedliche LPA-Konzentrationen von 100 nM bis 50 μM getestet. Geringe Calciumantworten konnten schon ab einer LPA-Konzentration von 1 μM nachgewiesen werden (Abbildung 24 A). Die Wirkung von LPA auf die intrazelluläre Calciumkonzentration ist in einer Konzentrations-Wirkungskurve in Abbildung 24 A dargestellt. Die stärkste Wirkung wurde bei 50 μM LPA nachgewiesen ($n = 50$ Zellen, Calciumwert $124 \pm 7,2$ nM), wobei schon bei 10 μM LPA eine starke Reaktion der stimulierten Zellen erfasst wurde ($n = 284$ Zellen, Calciumwert $102,8 \pm 12,6$ nM). Eine Dosis von 10 μM entspricht der physiologischen LPA-Konzentration im Serum und wird häufig in der Literatur für experimentelle Untersuchungen zitiert [8, 127, 128]. Für die weiteren Calciummessungen wurden daher jeweils 10 μM LPA eingesetzt. Abbildung 24 B zeigt beispielhafte Aufnahmen hippocampaler Neurone vor und nach einem LPA-Stimulus (10 μM).

Die Abbildung 24 C zeigt, dass der LPA-induzierte Anstieg des Calciums bereits nach wenigen Sekunden eintritt und transient war. Das Maximum des Ca^{2+} -Anstiegs wurde bereits nach ca. 75 bis 85 sek erreicht. Nach dem Auswaschen von LPA aus dem Messpuffer und einer Pause von ca. 10-15 min konnten die Neurone erneut mit LPA stimuliert und dadurch die Calciumantwort initiiert werden.

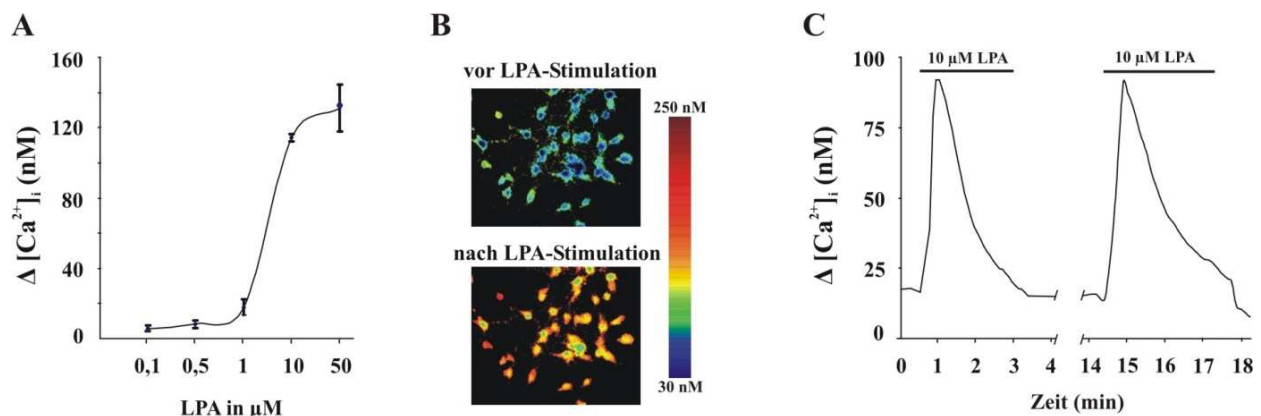


Abbildung 24: LPA-induzierter Ca^{2+} -Anstieg in primären hippocampalen Neuronen *in vitro*.

Die zellulären Ca^{2+} -Signale wurden auf Basis der Einzelzellmessungen mittels Fura-2/AM bestimmt. **A:** Die Konzentrations-Wirkungskurve zeigt die Abhängigkeit der zellulären Ca^{2+} -Konzentration von der applizierten LPA-Menge in Neuronen. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM für mindestens $n = 3$ Experimente, jedes mindestens drei Glasplättchen. **B:** Fluoreszenzaufnahmen in Neuronen (6-7 div), dargestellt in Falschfarben vor und nach LPA-Stimulus ($10 \mu\text{M}$). Blau repräsentiert niedrige Calciumkonzentrationen, in rot dargestellt sind die Bereiche mit hoher Calciumkonzentration. **C:** Eine Zeitkinetik der LPA-induzierten Calciumantwort zeigt ein transientes Verhalten und erreicht ihr Maximum zwischen 75 und 85 sek.

Um die an der Erhöhung der cytoplasmatischen Calciumkonzentrationen beteiligten LPA-Rezeptoren möglichst einzugrenzen, wurden zunächst Expressionsanalysen mittels qRT-PCR in 7 Tage kultivierten hippocampalen Neuronen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten in diesem Stadium die stärkste Expression des LPA2-Rezeptors (Abbildung 25 A). Anhand dieser Ergebnisse entstand die Hypothese, dass die Regulierung des LPA-induzierten, cytoplasmatischen Ca^{2+} -Anstiegs über den LPA2-Rezeptor erfolgt. Um dieser Frage nachzugehen und die Hypothese zu überprüfen, wurden Calciummessungen an primären hippocampalen Neuronen aus der LPA2-KO-Maus *in vitro* durchgeführt.

Die kultivierten hippocampalen Neuronen aus der LPA2-KO-Maus zeigten keine LPA-induzierte Reaktion im Hinblick auf einen Ca^{2+} -Anstieg ($n = 244$ Zellen, Calciumwert $8,6 \pm 0,2$ nM, Abbildung 25 B). Um die Vitalität und Reaktionsfähigkeit der Neuronen zu beweisen, wurde das LPA nach der Stimulation ausgewaschen und die Zellen anschließend mit 100 mM L-Glutamat (L-Glu) stimuliert. L-Glu ist ein Neurotransmitter und bindet an die Ligandengesteuerten-Ionenkanäle. Diese sind in Neuronen exprimiert und lassen die Ca^{2+} -Ionen aus dem extrazellulären Milieu in die Zelle passieren [129, 130]. Die Neurone zeigten die zu erwartende Erhöhung von intrazellulärem Calcium nach L-Glu-Stimulus ($n = 182$ Zellen, Calciumwert $146 \pm 1,2$ nM). Zum Vergleich und zur besseren Übersicht wurde parallel die Reaktion der Wildtyp-Neurone in Abbildung 25 B dargestellt.

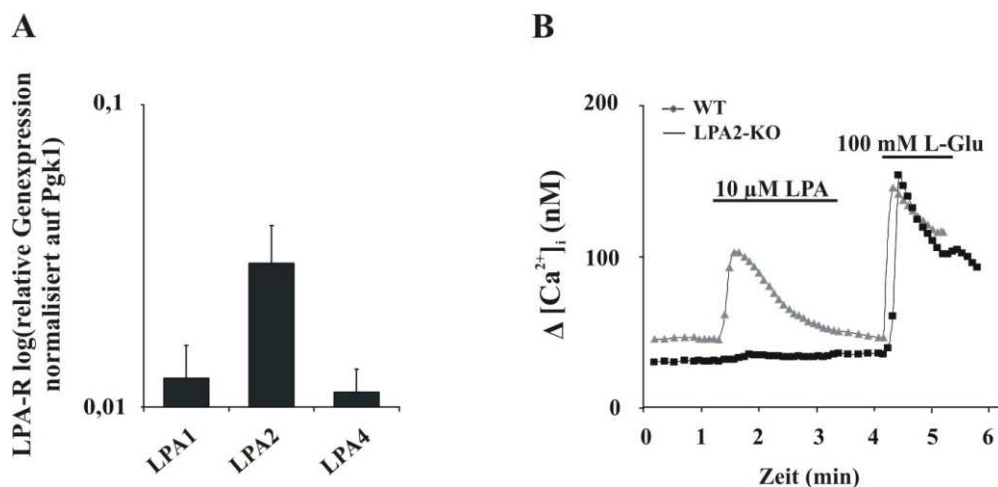


Abbildung 25: LPA-induzierter cytoplasmatischer Ca^{2+} -Anstieg *in vitro* wird über den LPA2-Rezeptor vermittelt.

A: Relativer LPA1-, 2- und 4-Rezeptor mRNA-Gehalt in primären hippocampalen Neuronen nach 7 Tagen in Kultur. Der Nachweis der mRNA-Niveaus wurde mittels qRT-PCR ermittelt und auf die Pfk1-Transkripte normalisiert. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD für $n = 3$ Experimente. **B:** Calciummessungen an primären hippocampalen Neuronen (6-7 div) aus Wildtyp- (WT) und LPA2-KO-Maus. Es wurde mit $10 \mu\text{M}$ LPA stimuliert und die Zeitkinetik digital aufgezeichnet. Das LPA wurde nach der ersten Messung ausgewaschen und nach einer Pause von 10-15 min mit 100 mM L-Glutamat (L-Glu) stimuliert.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen präsentieren, dass LPA zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in differenzierten hippocampalen Neuronen nach 7 Tagen *in vitro* führt. Die Expressionsstudien der LPA-Rezeptoren in 7 Tage kultivierten primären Neuronen lassen vermuten, dass der LPA-induzierte Ca^{2+} -Anstieg über den LPA2-Rezeptor vermittelt wird. Calciummessungen in LPA2-defizienten Neuronen bekräftigen diese Annahme.

4.6 Untersuchungen der Signaltransduktion des LPA-vermittelten Ca^{2+} -Anstiegs

Intrazelluläre Signalkaskaden, welche durch den LPA2-Rezeptor aktiviert werden, sind bereits vielfach untersucht [131-133]. Es wurden allerdings noch keine Studien in primären hippocampalen Neuronen durchgeführt. Nach der Bindung des Liganden und der Aktivierung des Rezeptors können daran $G_{12/13}$ -, G_i - und $G_{q/11}$ -Proteine binden. Sowohl G_i als auch $G_{q/11}$ sind in der Lage, die Phospholipase C (PLC) zu aktivieren, was zur Synthese von Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und anschließender Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) führt. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Signalwege, welche für die LPA-induzierte

Calciumfreisetzung von Bedeutung sind, zum ersten Mal in primären hippocampalen Neuronen *in vitro* analysiert werden.

Für diese Experimente wurden verschiedene, in der Literatur beschriebene Inhibitoren eingesetzt. Als erstes sollte die Frage nach den involvierten G-Proteinen geklärt werden. Zu diesem Zweck wurde das Pertussistoxin (PTX) eingesetzt, welches irreversibel die α -Untereinheit des G_i -Proteins inhibiert [134, 135]. Die Zellen wurden mit 100 ng/ml PTX und 10 min vorbehandelt [128], anschließend wurden 10 μ M LPA appliziert und die Calciumtransienten bestimmt. Die PTX-behandelten Zellen zeigten keinen Ca^{2+} -Anstieg als Reaktion auf LPA (Abbildung 26 A), was bedeutet, dass die LPA-vermittelte Wirkung mit der Bindung des G_i -Proteins an den LPA2-Rezeptor einhergeht ($n = 251$ Zellen, Calciumwert 9 ± 1 nM). Darüber hinaus lässt dieses Ergebnis vermuten, dass die LPA-induzierten Calciumtransienten aus den Speichern des ERs stammen müssten. Dafür sollte das nächste Glied in der IP_3 -Rezeptor-Aktivierungskette, die PLC, inhibiert werden. Für diesen Zweck wurden die Zellen mit einem zellmembranpermeablen spezifischen PLC-Inhibitor, U73122 (5 μ M, 5 min), oder seinem Analogon U73343 (5 μ M, 5 min), welches antagonistisch auf PLC wirkt, behandelt [136]. Der LPA-induzierte Calciumeffekt wurde durch das Einsetzen des PLC-Inhibitors komplett aufgehoben ($n = 222$ Zellen, Calciumwert $10,3 \pm 1$ nM). Der Einsatz von U73343 zeigte dagegen eine LPA-induzierte Reaktion der Zellen, wie sie schon in Kontrollexperimenten beobachtet wurde ($n = 214$ Zellen, Calciumwert $96,4 \pm 3,6$ nM; Abbildung 26 A). Um die Annahme noch weiter zu stützen, wurde ein membranpermeabler Inhibitor des IP_3 -Rezeptors, in der Membran von ER, Xestosponin C (XeC, 1 μ M und 5 min), eingesetzt [137]. Die Inhibierung führte dazu, dass ein Ca^{2+} -Signal nach der LPA-Applikation nicht mehr gemessen werden konnte ($n = 194$ Zellen, Calciumwert 10 ± 2 nM).

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass das LPA-induzierte intrazelluläre Calcium aus den Speichern des ERs stammt. Abbildung 26 B zeigt eine schematische Darstellung der intrazellulären Signalkette, aktiviert über den LPA2-Rezeptor nach Bindung des Liganden. Die verwendeten Inhibitoren sind in der Abbildung rot umkreist.

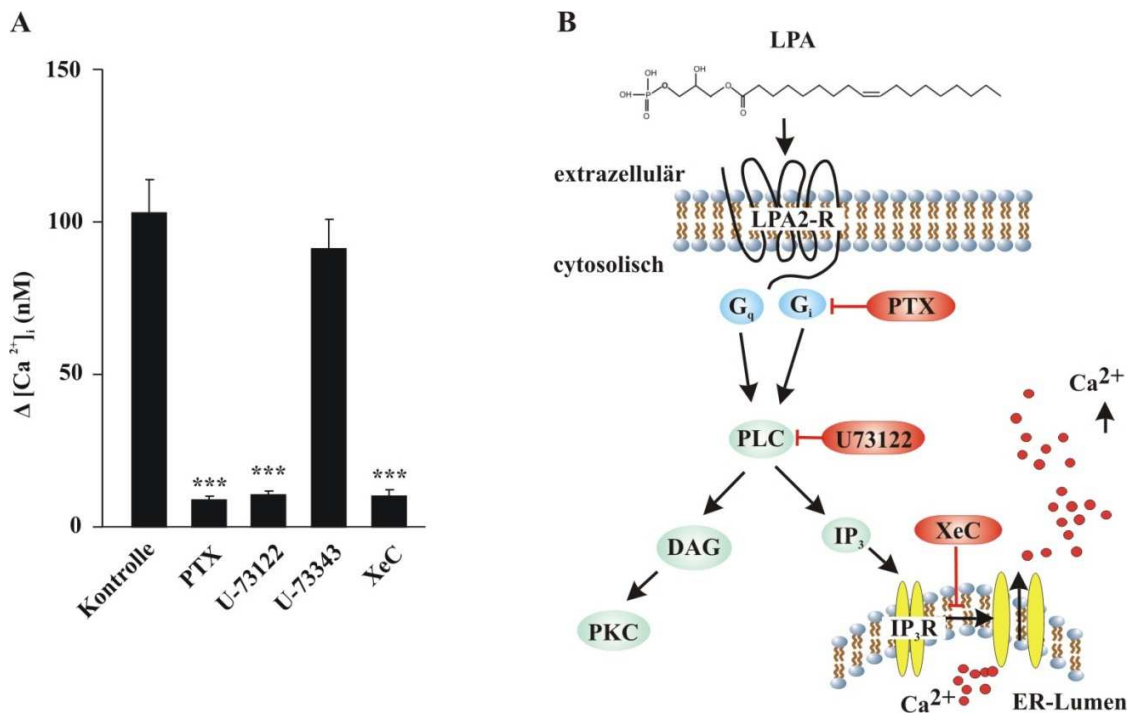


Abbildung 26: LPA-induzierter intrazellulärer Ca²⁺-Anstieg wird über das G_i-Protein vermittelt.

A: Calciummessungen in hippocampalen Neuronen *in vitro* (6-7 div) mittels Fura-2/AM. Die Verwendung von verschiedenen Inhibitoren zeigte, dass LPA-induzierte Ca²⁺-Freisetzung über die Aktivierung des G_i-Proteins reguliert wird. Die Werte sind Mittelwerte ±SEM von mindestens n = 3 Experimenten, jedes mindestens zwei Deckgläschen gemessen (ungepaarter *t*-Test, ***p < 0,0005 gegen die entsprechende Kontrolle). Direkte Applikation von 10 μM LPA, n = 103 Zellen, Calciumwert 102,8±10,9 nM. Inkubation mit PTX = Pertussistoxin (100 ng/ml, 10 min), n = 251 Zellen, Calciumwert 9±1 nM, U-73122 = Phospholipase C-Agonist (5 μM, 5 min), n = 222 Zellen, Calciumwert 10,3±1 nM, U-73343 = Phospholipase C-Antagonist (5 μM, 5 min), n = 214 Zellen, Calciumwert 96,4±3,6 nM und XeC = Xestospongin C (1 μM, 5 min), n = 194 Zellen, Calciumwert 10±2 nM. **B:** Schematische Darstellung der LPA2-Rezeptor-vermittelten intrazellulären Signaltransduktion mit den verwendeten Inhibitoren, rot unterlegt. ER = endoplasmatisches Retikulum.

Um einen weiteren Beweis dafür zu liefern, dass das freigesetzte Calcium nach einem LPA-Stimulus aus dem ER stammt, wurde Thapsigargin (Thg) eingesetzt. Thapsigargin ist ein zellpermeabler, irreversibler Inhibitor der Ca²⁺-ATPase des ER und verhindert somit das Wiederauffüllen der entleerten Speicher [138, 139]. Gleichzeitig führt eine Behandlung mit Thg zur Entleerung des ERs vom Calcium [140, 141]. Abbildung 27 A zeigt zunächst eine typische, LPA-induzierte Reaktion in Neuronen (n = 59 Zellen, Calciumwert 63±2 nM). Nach dem Auswaschen von LPA mit dem Messpuffer und einer Ruhepause von 10-15 min wurden die Zellen mit Thapsigargin (5 μg/ml) stimuliert. Die Zellen reagierten ebenfalls mit einem intrazellulären Calciumanstieg (n = 59 Zellen, Calciumwert 56±2 nM, Abbildung 27 A). In einer weiteren Untersuchung sollte das ER durch Thg-Behandlung entleert und das Wiederauffüllen der Speicher ver-

hindert werden. Abbildung 27 B zeigt das Resultat des Experimentes. Nach Applikation von Thg reagierten die Zellen mit einer Calciumerhöhung im Cytoplasma ($n = 48$ Zellen, Calciumwert 89 ± 2 nM). Nach einem anschließenden Stimulus mit LPA jedoch konnte keine Calciumtransiente mehr verzeichnet werden ($n = 48$ Zellen, Calciumwert $6 \pm 0,2$ nM). Um zu prüfen, ob die Zellen noch reaktionsfähig waren, erfolgte nach dem Auswaschen von LPA eine Applikation von L-Glutamat. Diese Kontrollmessung bestätigte die Vitalität der Zellen ($n = 48$ Zellen, Calciumwert $84 \pm 0,5$ nM, Abbildung 27 B).

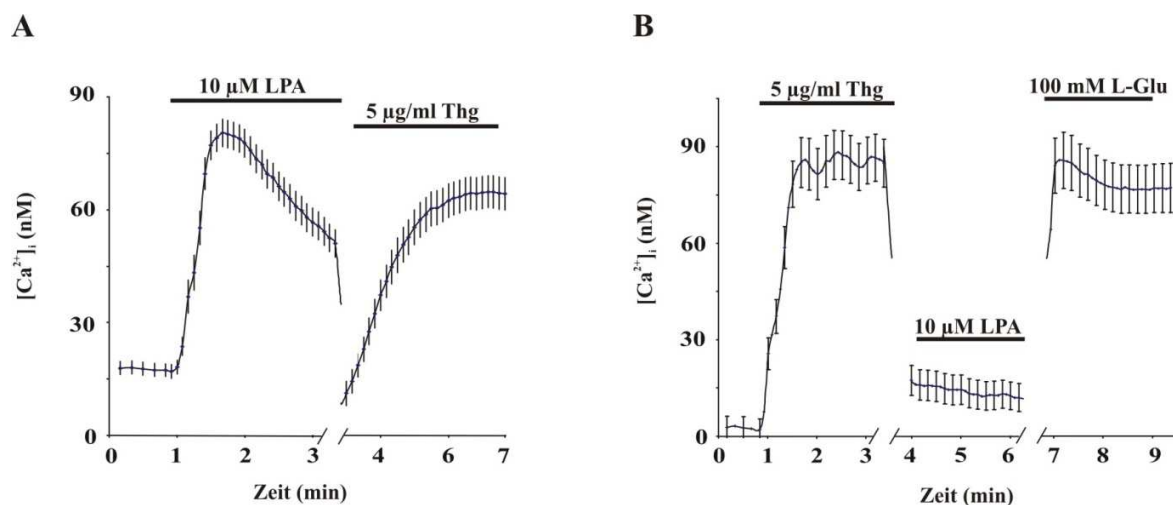


Abbildung 27: LPA bewirkt eine Freisetzung der Ca^{2+} -Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum.

Fura-2/AM-Calciummessungen in primären hippocampalen Neuronen *in vitro* (6-7 div), die mit Thg ($5 \mu\text{g/ml}$), LPA ($10 \mu\text{M}$) oder L-Glu (100 mM) stimuliert wurden. Stimulation mit den verwendeten Substanzen erfolgte durch direkte Applikation auf die Zellen und zeigt, dass der LPA-induzierter Ca^{2+} -Anstieg im Cytoplasma aus den Speichern des ERs stammt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM von $n = 3$ Experimenten, jedes mindestens zwei Deckgläschen.

Durch die durchgeführten Untersuchungen der cytoplasmatischen Calciumerhöhung konnten die durch LPA aktivierten Signalkaskaden aufgeklärt werden. Diese Arbeit demonstriert, dass das freigesetzte Calcium aus den intrazellulären Speichern des ERs stammt. Die Aufklärung der beteiligten Signalkaskaden hat gezeigt, dass LPA selektiv über das G_i -Protein die intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung vermittelt. Dafür bedarf es einer anschließenden Aktivierung von PLC und des IP_3 -Rezeptors.

4.7 Inhibierung der Ca^{2+} -Kanäle und LPA-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung

Der Calciumeinstrom in die präsynaptischen Terminalien über die spannungsgesteuerten Calciumkanäle ist ein wichtiger Schritt hin zur Fusion der Vesikel und der Freisetzung der Neurotransmitter. Obwohl die in dieser Arbeit erhobenen Daten eine ER-abhängige Calciumfreisetzung durch LPA-Stimuli präsentieren, stellt sich dennoch die Frage nach der Rolle den spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen in diesem Prozess. Um dies zu klären, sollten Untersuchungen durchgeführt werden, bei denen spezifische Blocker für die in Neuronen exprimierten Calciumkanäle zum Einsatz kamen. Die interessantesten Kandidaten unter den Calciumkanälen waren dabei die überwiegend in den präsynaptischen Terminalien vorkommenden und für die Neurotransmitterfreisetzung verantwortlichen N- und P/Q-Typ-Kanäle [91, 92].

Zunächst wurden die Zellen mit LPA behandelt und die Calciumtransienten aufgezeichnet, um die Reaktionsfähigkeit der Neurone auf LPA zu überprüfen. Nach einer positiven Reaktion wurde das LPA aus den Zellen ausgewaschen und die Zellen mit spezifischen Inhibitoren behandelt. Anschließend wurden die Zellen erneut mit LPA stimuliert und die Calciumantwort gemessen. Die Abbildung 28 A und B fasst die Ergebnisse dieser Untersuchung zusammen.

Das ω -Agatoxin-TK ist ein spezifischer, irreversibler Inhibitor der P/Q-Typ-Kanäle [142, 143] und wurde als erster Blocker für die Analysen herangezogen. Die Behandlung brachte eine ungefähr 3-fache Reduktion der Calciumtransienten im Vergleich zu unbehandelten Zellen ($n = 325$ ω -Agatoxin-TK, $2 \mu\text{M}$ [144], Calciumwert $39,4 \pm 3 \text{ nM}$). Interessanterweise konnte nach der Behandlung mit ω -Conotoxin-GVIA, einem irreversiblen Inhibitor der N-Typ-Kanäle [145], eine Reduktion um das 1,5-fache erzielt werden ($n = 159$ ω -Conotoxin-GVIA, 500 nM [146], Calciumwert $66 \pm 1 \text{ nM}$). Die Inhibierung mittels Nifedipin ($10 \mu\text{M}$, [147], $n = 55$ Zellen, Calciumwert $134,2 \pm 7 \text{ nM}$), einem L-Typ-Kanal-Blocker [148] sowie SNX-842 ($1 \mu\text{M}$, [149], $n = 59$ Zellen, Calciumwert $106,8 \pm 4 \text{ nM}$), welches die R-Typ-Kanäle inhibiert [150], zeigten keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrollzellen.

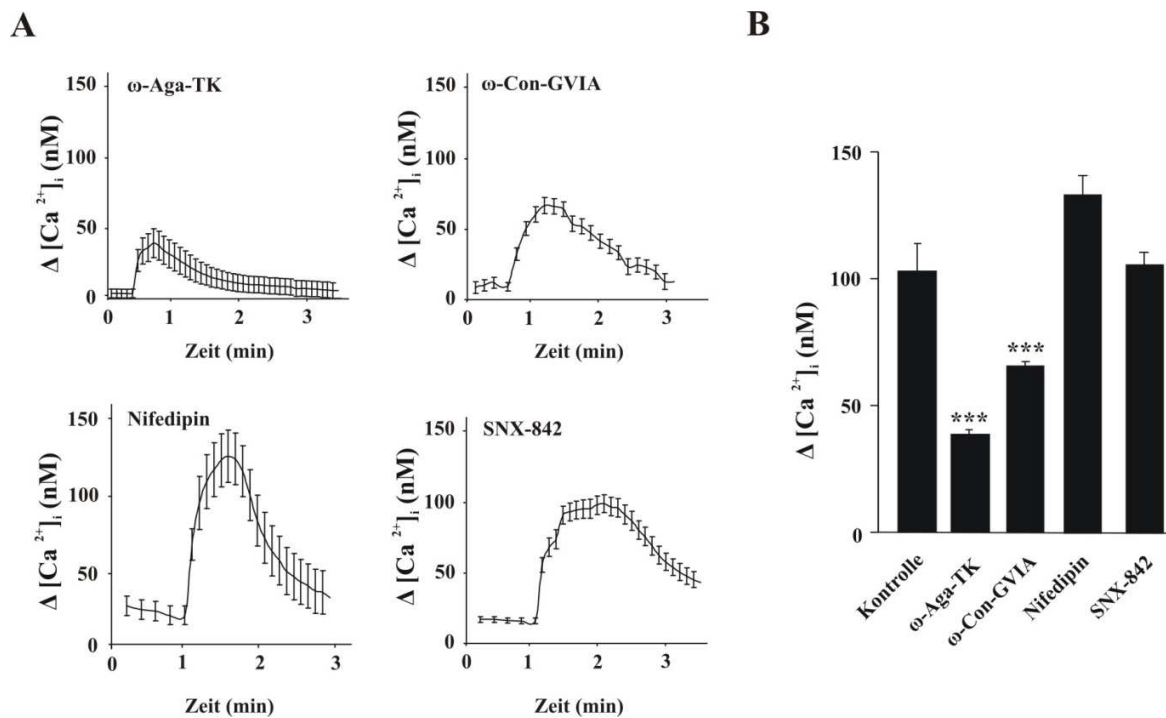


Abbildung 28: Inhibierung der Ca²⁺-Typ-Kanäle führt zu einer Abschwächung der LPA-induzierten Ca²⁺-Antwort.

A: Repräsentative Darstellung der Calciumtransienten für verschiedene Calciumkanal-Typ-spezifischen Inhibitoren. Primäre hippocampale Neurone *in vitro* (6-7 div) wurden nach der Behandlung mit ω-Agatoxin-TK (ω-Aga-TK, 2 μM und 5 min), ω-Conotoxin-GVIA (ω-Con-GVIA, 500 nM, 5 min), Nifedipin (10 μM, 5 min) und SNX-842 (1 μM, 5 min) behandelt und die LPA-Reaktion der Zellen mittels Fura-2/AM gemessen. Die Werte sind Mittelwerte ±SEM für n = 3 Experimente, jedes mindestens zwei Glasplättchen. **B:** Kontrolle (10 μM LPA) n = 103 Zellen, Calciumwert 102,8±10,9 nM; ω-Agatoxin-TK n = 325 Zellen, Calciumwert 39,4±3 nM; ω-Conotoxin-GVIA n = 159 Zellen, Calciumwert 66±1,4; Nifedipin n = 55 Zellen, Calciumwert 134,2±7,2 nM; SNX-842 n = 59 Zellen Calciumwert 106,8±4 nM. Die Werte sind Mittelwerte ±SEM von mindestens n = 3 Experimenten, jedes mindestens zwei Deckgläschen gemessen (ungepaarter *t-Test*, ***p < 0,0005 gegen die entsprechende Kontrolle).

Die Untersuchung zeigte eine signifikante Reduktion der Ca²⁺-Antwort nach dem Blocken von P/Q- und N-Typ-Kanälen. Diese Reduktion des Calciumanstiegs könnte ein Hinweis darauf sein, dass LPA zum lokalen Calciumanstieg in den präsynaptischen Bereichen führt. Um dieser Hypothese experimentell nachzugehen, wurden Calciumtransienten in den präsynaptischen Terminalien gemessen.

4.8 LPA-induziert den Ca²⁺-Anstieg in den präsynaptischen Terminalien

P/Q-Typ- und N-Typ-Kanäle sind hauptsächlich in den präsynaptischen Terminalien lokalisiert [90]. Die somatischen Calciummessungen ergaben, dass durch Inhibierung dieser Kanäle

die Calciumtransienten reduziert wurden. Aufgrund dieser Daten entstand die Hypothese, dass LPA womöglich noch nicht bekannte Effekte in der Präsynapse auslösen könnte. Von Bedeutung war es daher, zu untersuchen, ob LPA zu einer lokalen Erhöhung des Calciums in der Präsynapse führen kann. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden Calciummessungen in synaptischen Terminalien durchgeführt.

Um die Synapsen zu markieren, wurden die Zellen (7 bis 10 Tage in Kultur) mit einem SynaptopHluorin-Konstrukt transfiziert und weitere 3 bis 5 Tage kultiviert (s. Abbildung 30). Da SynaptopHluorin grün fluoresziert, wurde FuraRed/AM, ein zellpermeabler Calciumindikator, eingesetzt, um die Calciumtransienten zu bestimmen. Die Zeitkinetik dauerte 3 min, wobei alle 8 sek ein Bild aufgenommen wurde. Die Auswertung erfolgte, indem eine *region of interest* (ROI) um den präsynaptischen Bereich gesetzt (grüner Punkt, markiert durch SynaptopHluorin) und anschließend die Fluoreszenzintensität im Verlauf der Bildsequenzen mit der Software Cell[^]P bestimmt wurde.

Die Abbildung 29 A zeigt beispielhaft eine Aufnahme einer solchen Messung. Im roten Kanal erscheinen die Axone und Dendriten, gefüllt mit FuraRed/AM, und im grünen Kanal mit SynaptopHluorin transfizierte Axone. SynaptopHluorin wird in der Membran der sekretorischen synaptischen Vesikel exprimiert [151] und dient in diesem Experiment als ein Marker für die präsynaptischen Terminalien. Die SynaptopHluorin-positiven Punkte, die auch für die Auswertung verwendet wurden, sind mit Pfeilen markiert. Die Abbildung 29 B zeigt beispielhaft eine Darstellung der Zeitkinetik für einen SynaptopHluorin-positiven Punkt nach LPA-Stimulation.

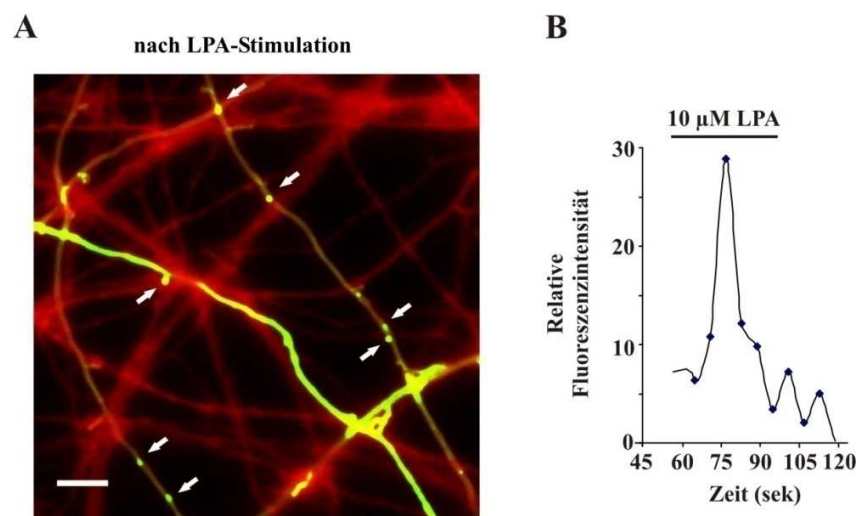


Abbildung 29: LPA führt zum Ca^{2+} -Anstieg in präsynaptischen Terminalien in hippocampalen Neuronen in vitro.

A: Beispielhafte fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Neurone (7-10 div) gefüllt mit FuraRed (rot) und SynaptopHluorin (grün) exprimierenden Axonen nach LPA-Stimulus. ROIs (*region of interest*) wurden um die grün fluoreszierenden Punkte gesetzt (mit Pfeilen markiert), welche die synaptischen Terminalien markieren sollten und die Fluoreszenzzunahme des FuraRed/AM-Signals mittels Software Cell[^]P (Olympus) bestimmt. Balken beträgt 5 μm . **B:** Repräsentative Darstellung der Fluoreszenzzunahme innerhalb eines ROIs für einen grün fluoreszierenden Punkt nach LPA-Stimulation (10 μM). Die Zeitkinetik nach der LPA-Applikation zeigt einen Anstieg des Calciumsignals nach wenigen sek und die erreichte maximale Fluoreszenz nach ca. 15 sek.

Das Ergebnis macht deutlich, dass LPA direkt in den präsynaptischen Terminalien bereits nach 3-5 sek zu Calciumtransienten führt, welche nach ca. 15 sek das Maximum erreichen. Die gestiegene intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration löst die Exozytose von transmitterenthaltenden Vesikeln aus, die ihren Inhalt in den synaptischen Spalt entleeren [82]. In Betracht der erhobenen Daten kristallisierte sich heraus, dass LPA, durch Induktion des lokalen Ca^{2+} -Anstiegs in präsynaptischen Terminalien, zur Freisetzung der Vesikel führen könnte.

4.9 LPA reguliert den Vesikelzyklus

Die Freisetzung der Neurotransmitter basiert auf einer sehr komplexen Exozytosemaschinerie der präsynaptischen Vesikel. Um diesen komplizierten Vorgang zu koordinieren, ist ein streng organisiertes Zusammenspiel zwischen Proteinen und Lipiden notwendig [82, 83]. Mehrere Studien zeigten, dass Lipide, insbesondere Phospholipide, und Protein-Lipid-Interaktionen eine wichtige Rolle während der Endo- und Exozytose sowie der Regeneration der synaptischen Vesikel spielen [99].

Gestützt auf die Erkenntnis, dass LPA das Calcium in den präsynaptischen Terminalien ansteigen lässt, sollte analysiert werden, ob LPA einen Einfluss auf den Zyklus synaptischer Vesikel in hippocampalen Neuronenkulturen hat. Aufgrund der Tatsache, dass präsynaptischer Calciumeinstrom zu Vesikelfusion führt [82], entstand die Hypothese, dass LPA möglicherweise auch die Ausschüttung der Vesikel in Neuronen beeinflussen könnte.

Um dieser Hypothese nachzugehen, sollte der Prozess des Vesikelzyklus in primären hippocampalen Neuronen mittels *live imaging* beobachtet und analysiert werden. Dafür wurde die SynaptopHluorin-Technik angewendet. Diese Methode hat sich als gutes Modell für die Untersuchung des synaptischen Vesikelzyklus etabliert [151]. In der Abbildung 30 ist das Prinzip dieser Methode schematisch dargestellt.

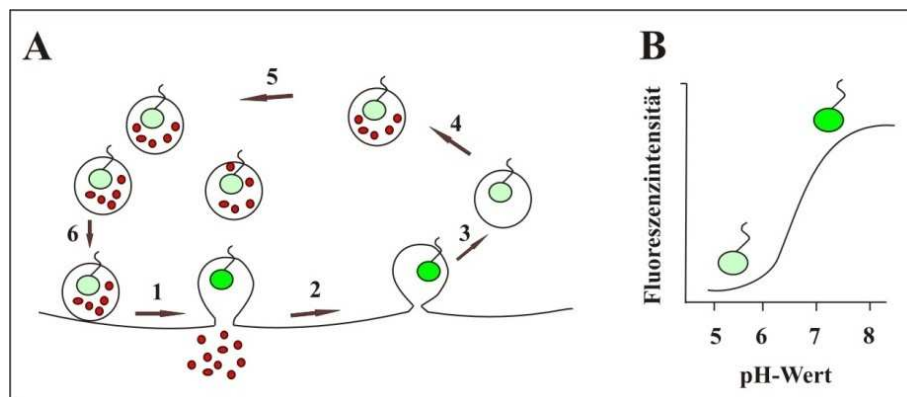


Abbildung 30: Darstellung des SynaptopHluorin-Modells.

In der Ruhephase wird die Fluoreszenz des pHluorins durch das saure Milieu des Vesikels ($\text{pH} \sim 5,5$) unterdrückt. Während der Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran wird der pH-Wert entsprechend dem extrazellulären auf $\sim 7,4$ angepasst, wodurch die Fluoreszenz des pHluorins zunimmt. Nach der Endozytose kommt es zur Ansäuerung des Vesikels und zu erneuter Unterdrückung der Fluoreszenz. **A:** Illustration des Vesikelzyklus: (1) Fusion und Exozytose, (2) Endozytose, (3) saure Hydrolyse, (4) Neurotransmitter Aufnahme, (5) Lagerung gefüllter synaptischer Vesikel in der aktiven Zone, (6) Anlagerung an die Membran. **B:** Das Diagramm zeigt die pH-Wert-Empfindlichkeit des pHluorins. Modifiziert nach [151].

Primäre hippocampale Neurone wurden 7 bis 10 Tage kultiviert, bevor sie mit SynaptopHluorin-Konstrukt transient transfiziert wurden. Die Messexperimente erfolgten drei bis fünf Tage später. Die Ergebnisse sind in Abbildung 31 dargestellt.

Die Untersuchung zeigte, dass LPA zu einer Exozytose der SynaptopHluorin-tragenden Vesikel führt (Abbildung 31 A). Als Kontrolle wurden parallel Messungen mit L-Glu-Applikationen durchgeführt. Dabei wurde beobachtet, dass die Fluoreszenz der Vesikel nach der LPA-Applikation länger erhalten blieb als nach einem L-Glu-Stimulus. Um diese Beobachtung statistisch zu prüfen, wurde um jedes freigesetzte Vesikel eine ROI gesetzt und das Fluoreszenzverhalten zur Aufnahmezeit bestimmt. Anschließend wurde der Abfall der Fluoreszenz für jedes Vesikel exponentiell gefittet und die Zeitkonstante (τ) bestimmt. Die Untersuchung brachte hervor, dass die LPA-abhängig freigesetzten Vesikel tatsächlich eine längere Fluoreszenzdauer aufweisen. (Abbildung 31 B). Die Zeitkonstante der LPA-induzierten Fluoreszenz betrug 122 sek, während die durch L-Glu hervorgerufene Fluoreszenz nach 43,7 sek vollständig unterdrückt und nicht mehr detektierbar war.

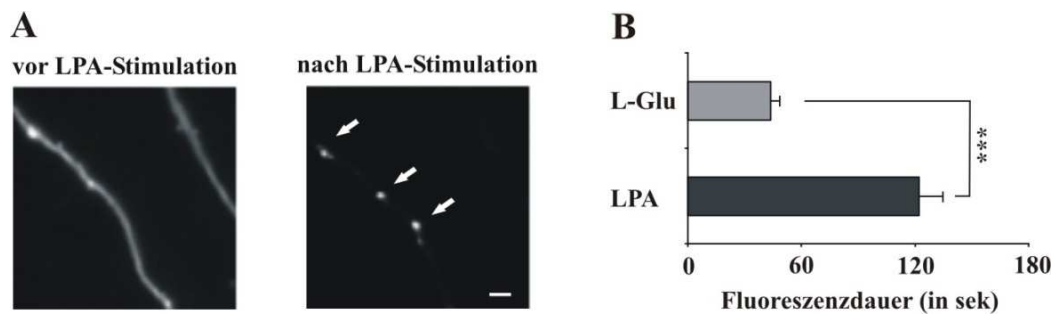


Abbildung 31: LPA führt zur SynaptopHluorin-Fluoreszenz.

A: Repräsentativer Ausschnitt der SynaptopHluorin-exprimierenden Axone (primäre hippocampale Neurone 12-15 Tage *in vitro*) vor LPA-Stimulation (links) und am Maximum der Fluoreszenz (rechts), hervorgerufen durch LPA-induzierte Exozytose. Vor LPA-Stimulation zeigen die Axone eine schwache und gleichmäßige Fluoreszenz. Nach 3-5 Aufnahmen bleicht die unspezifische Fluoreszenz aus und die fusionierten Vesikel leuchten auf (im rechten Bild mit Pfeilen markiert). Nach der Messung wurde eine ROI um jeden aufleuchtenden Vesikel gesetzt und die Fluoreszenzzunahme und -dauer bestimmt. Balken beträgt 1 μm . **B:** Darstellung der Zeitkonstante, die notwendig war, bis die Vesikel wieder angesäuert waren und ihre Fluoreszenz unterdrückt war. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM für $n = 3$ Experimente und $n = 36$ reagierenden Vesikel für LPA und $n = 35$ reagierenden Vesikel für L-Glutamat (L-Glu), *t-Test*, *** $p < 0,0005$. Die Bestimmung der Zeitkonstante (τ) erfolgte mit der Software Origin 7 (MicroCal Inc.).

Äquivalent wurden die Messungen mit hippocampalen Neuronen aus einer LPA2-KO-Maus durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, dass LPA2-defiziente Neurone nicht auf LPA reagieren ($n = 4$ Glasplättchen, 9 ± 1 fusionierte Vesikel) und nur spontane Exozytose der Vesikel aufweisen (Abbildung 32). Auch in dieser Untersuchung wurde durch einen Stimulus mit L-Glu überprüft, ob die Neurone vital waren. Die Behandlung mit L-Glu zeigte in LPA2-defizienten Neuronen die gleiche Reaktion wie sie bereits in Wildtyp-Neuronen beobachtet wurde.

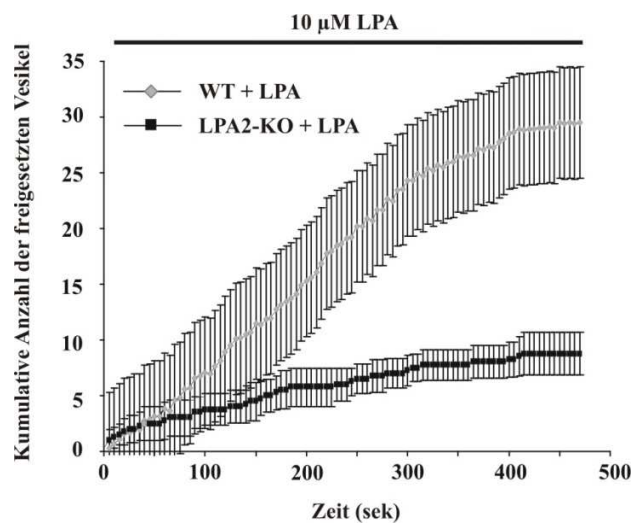


Abbildung 32: LPA induziert Exozytose in hippocampalen Neuronen *in vitro* aus Wildtyp- aber nicht LPA2-KO-Maus.

Nach einer Applikation von LPA auf primäre hippocampale Neurone aus Wildtyp- oder LPA2-KO-Maus wurden 8 min lang Echtzeitaufnahmen durchgeführt. Die freigesetzten Vesikel wurden in Korrelation zur Messzeit kumulativ gezählt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus $n = 4$ Glasplättchen für LPA2-KO- (9 ± 1 Vesikel) und $n = 10$ Glasplättchen für Wildtyp-Neurone (30 ± 3 Vesikel). Primäre Neurone aus der LPA2-KO-Maus zeigten nur spontane und nicht LPA-induzierte Exozytose der synaptischen Vesikel.

Mittels *live imaging*-Experimenten wurde erneut bestätigt, dass der LPA-Effekt über den LPA2-Rezeptor vermittelt wird. In Anbetracht dieser Ergebnisse kann vermutet werden, dass der LPA2-Rezeptor direkt in der Präsynapse vorhanden sein müsste, um dort die Signalkaskade aktivieren und die neuronale Transmission regulieren zu können.

4.10 LPA reguliert die exzitatorische Transmission

In den folgenden Untersuchungen sollte geklärt werden, ob der LPA2-Rezeptor in den präsynaptischen Arealen lokalisiert ist. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden hippocampale Neurone *in vitro* immunocytochemisch mit anti-LPA2 und synaptische Terminalien mit anti-VGLUT1 und anti-VGAT sichtbar gemacht. Bei VGLUT1 (*vesicular glutamate transporter 1*) handelt es sich um ein Transportprotein für das Neurotransmitter Glutamat, mit dem selektiv die glutamatergen (exzitatorischen) Synapsen markiert wurden. VGAT (*vesicular GABA transporter*) ist ein Transportprotein für den Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) und wurde als Markerprotein für die Darstellung der GABAergen (inhibitorischen) Synapsen ausgewählt. Die immunocytochemischen Färbungen zeigten, dass der endogene LPA2-Rezeptor tatsächlich in den Synapsen nachweisbar ist. Darüber hinaus konnte LPA2 mit dem Signal von VGLUT1 kolo-kalisiert werden. Das Signal von VGAT wurde benachbart zu dem von LPA2 beobachtet (Abbildung 33 A). Das zeigt, dass der LPA2-Rezeptor nicht nur synaptisch lokalisiert ist, sondern spezifisch in den synaptischen Terminalien der glutamatergen (asymmetrischen, exzitatorischen) Neuronen exprimiert wird.

Um dies noch deutlicher hervorzuheben, wurde eine DAB-Färbung für den endogenen LPA2-Rezeptor in primären hippocampalen Neuronen *in vitro* angefertigt und elektronenmikroskopisch analysiert. In den Untersuchungen lag der Fokus besonders auf der Lokalisation des LPA2-Rezeptors in symmetrischen und asymmetrischen Synapsen. Bei den asymmetrischen Synapsen handelt es sich um die glutamatergen Synapsen (exzitatorisch) und bei symmetrischen

Synapsen um GABAerge Synapsen (inhibitorisch). Die Lokalisation des endogenen LPA2-Rezeptors konnte in der präsynaptischen Membran einer asymmetrischen Synapse gezeigt werden. In symmetrischen Synapsen dagegen war der LPA2-Rezeptor nicht nachweisbar (Abbildung 33 B). Die Intensität des DAB-Signals für den endogenen LPA2-Rezeptor in asymmetrischen und symmetrischen Synapsen wurde zu ungefärbten Kontrollpräparaten mittels ImageJ-Software quantifiziert und in der Abbildung 33 C gezeigt.

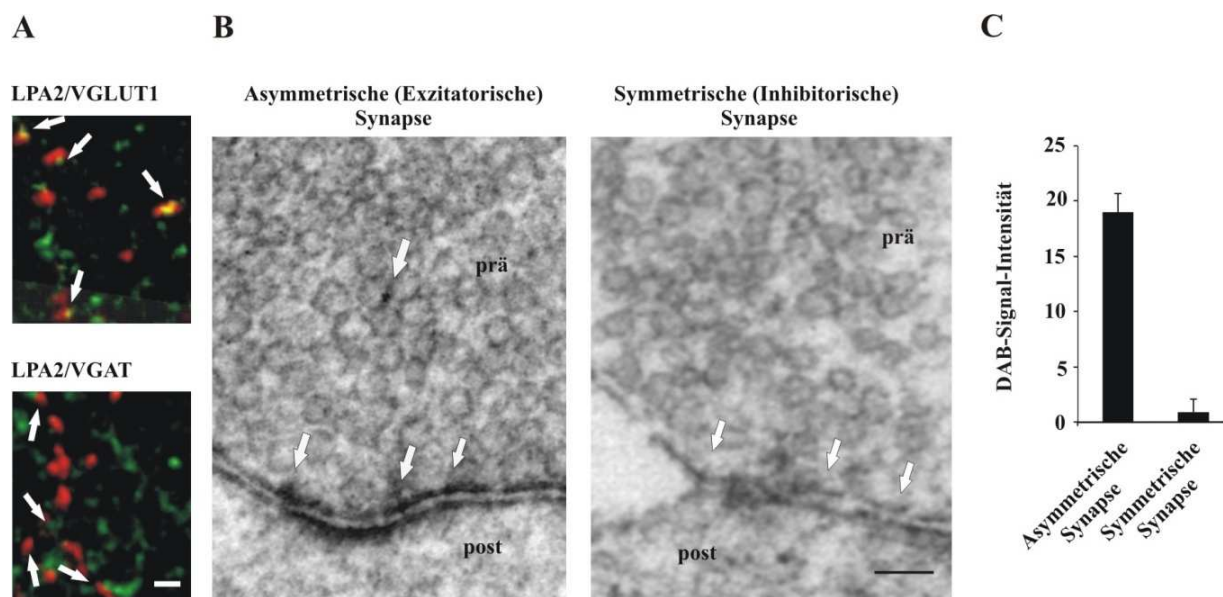


Abbildung 33: LPA2-Rezeptor ist in der synaptischen Membran der glutamatergen Neuronen lokalisiert.

A: Konfokalmikroskopische Aufnahmen der primären hippocampalen Neuronen (7 div) gefärbt mit anti-LPA2 in Kombination mit anti-VGLUT1 oder anti-VGAT. Die Kolokalisation des LPA2-Rezeptors mit VGLUT1 ist mit Pfeilen markiert. Balken beträgt 5 μm . **B:** DAB-Färbung der primären hippocampalen Neuronen (div 7) mit anti-LPA2. Aufnahmen wurden mittels eines Elektronenmikroskops angefertigt und das LPA2-Signal bzw. die synaptische Membran mit Pfeilen markiert. Balken beträgt 50 nm, (prä) = präsynaptische und (post) = postsynaptische Terminalien. **C:** Quantifizierung der Intensität des endogenen LPA2-Signals dargestellt durch DAB-Methode, mittels frei verfügbarer ImageJ-Software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Die Werte sind Mittelwerte \pm SD für n = 3 Experimente.

Es wurde demonstriert, dass der LPA2-Rezeptor in der präsynaptischen Membran der glutamatergen und nicht der GABAergen Neuronen lokalisiert ist. Das zeigt, dass die LPA-induzierte Vesikelexozytose, direkt über den LPA2-Rezeptor vermittelt, spezifisch in den Synapsen exzitatorischer Zellen stattfindet. Um die Untersuchungen zu erweitern, sollte zusätzlich geprüft werden, ob die Ausschüttung der Vesikel tatsächlich nur auf glutamaterge Neurone begrenzt ist. Dazu wurden zunächst ultrastrukturelle Untersuchungen an primären Neuronen durchgeführt. Die primären Neurone (14 div) wurden 10 min mit 10 μM LPA-behandelt, fixiert und anschlie-

ßend im Elektronenmikroskop analysiert. Der Fokus der Aufnahmen lag im Bereich der präsynaptischen Dichte. Die Quantifizierung der Vesikel erfolgte an der aktiven Zone der präsynaptischen Terminalien. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigte, dass LPA-behandelte Zellen weniger Vesikel an der aktiven Zone besitzen. Dieser Effekt, wie in Abbildung 34 gezeigt, konnte nur in glutamatergen, asymmetrischen (ohne LPA $n = 20$, LPA behandelt $n = 21$) und nicht in GABAergen, symmetrischen (ohne LPA $n = 25$, LPA behandelt $n = 25$) Synapsen beobachtet werden.

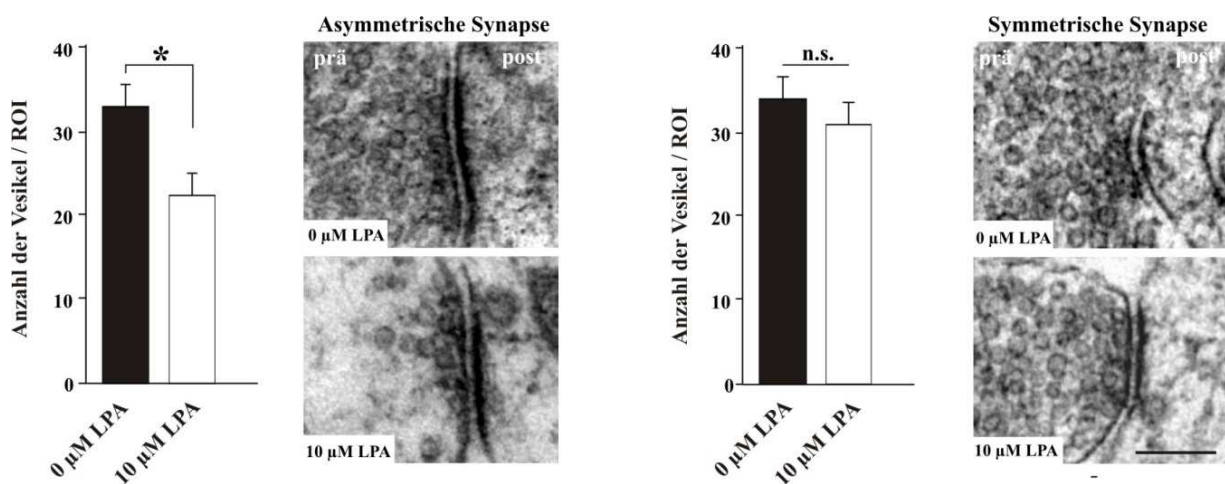


Abbildung 34: LPA agiert ausschließlich an exzitatorischen Synapsen.

Ultrastrukturelle Analysen zeigen eine LPA-induzierte Reduktion der Vesikel auf asymmetrischen Synapsen. Für die Analysen wurden primäre hippocampale Neurone nach 14 Tagen *in vitro* verwendet. Die Vesikel in symmetrischen Synapsen zeigen keinen Unterschied im Vergleich zu unbehandelten Kontrollpräparaten. Anzahl der asymmetrischen (exzitatorischen) Synapsen: $n = 20$ Kontrolle ohne LPA, $n = 21$ mit LPA (links). Anzahl der symmetrischen (inhibitorischen) Synapsen: $n = 25$ Kontrolle ohne LPA, $n = 25$ mit LPA (rechts). Mann-Whitney-U-Test, $*p < 0,05$, n.s. = nicht signifikant gegenüber der entsprechenden Kontrolle. Balken beträgt 100 nm, (prä) = präsynaptische und (post) = postsynaptische Terminalien. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM für $n = 3$ Experimente.

Um zu untersuchen, ob LPA zu einem Verlust der Vesikel führt oder einen retrograden Transport der Vesikel zum Axon induziert, wurden zusätzlich zu *live imaging*-Experimenten aus primären hippocampalen Neuronen nach 14 Tagen *in vitro* synaptische Vesikel-Fractionen isoliert. Dafür wurden die Zellen 10 min mit 10 μ M LPA stimuliert und anschließend sofort lysiert. Die durch Ultrazentrifugation gewonnenen Fraktionen wurden im Western Blot analysiert. Die Immundetektion erfolgte mit anti-VGLUT1 und anti-VGAT. Für die Normalisierung der Signalintensität wurden die Immunblots mit anti-VAMP1, welches in der Membran der synaptischen Vesikel vorkommt und unabhängig vom Subtyp der Neuronen exprimiert wird, inkubiert. Die

Signalintensität der Banden im Immunblot wurde anschließend mit der Software ImageJ nach dem Einscannen der Röntgenfilme bestimmt und zum VAMP1-Signal normalisiert. Für die Quantifizierung wurden drei unabhängige Immunblots verwendet.

Wie in der Abbildung 35 ersichtlich, wurde im Immunblot nach Stimulation mit LPA eine signifikante Reduktion des VGLUT1-Signals um 32,3% beobachtet (VGLUT1-Signalintensität normalisiert zu VAMP1 mit LPA = $0,21 \pm 0,1$, ohne LPA = $0,65 \pm 0$). Die Intensitätsstärke für das VGAT dagegen zeigte keine Veränderung (VGAT normalisiert zu VAMP1 mit LPA = $0,45 \pm 0,1$, ohne LPA = $0,46 \pm 0,1$).

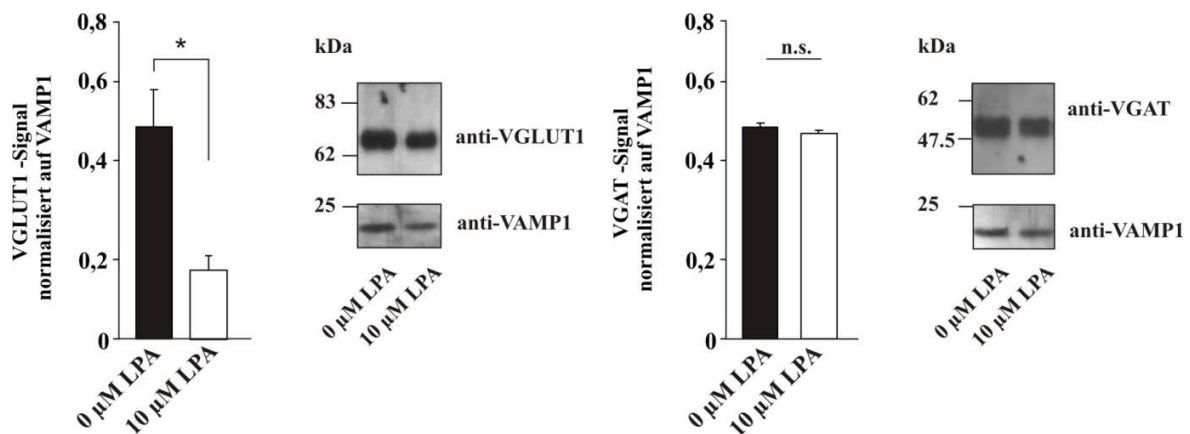


Abbildung 35: LPA reduziert das VGLUT1-Signal im Immunblot.

Primäre hippocampale Neurone wurden 10 min mit $10 \mu\text{M}$ LPA behandelt und anschließend lysiert. Aus dem Zellysat wurden mittels Ultrazentrifugation Synapsen-Fraktionen isoliert und im Immunblot analysiert. Die Detektion erfolgte entweder mit einem anti-VGLUT1 (links) oder anti-VGAT (rechts). Für die Normalisierung folgte eine anschließende Inkubation der Membranen mit anti-VAMP1. Die Quantifizierung der Signalintensität erfolgte mit der Software ImageJ. Die Signalintensität von VAMP1 wurde jeweils auf 1 gesetzt. Es wurde eine Reduktion des VGLUT1-Signals im Western Blot um 32,3% errechnet, Mann-Whitney-U-Test $*p < 0,05$, n.s. = nicht signifikant gegen die entsprechende Kontrolle. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM für $n = 3$ Experimente.

Die durchgeführten Analysen zeigten, dass eine Behandlung mit $10 \mu\text{M}$ LPA zu einer Freisetzung der synaptischen Vesikel führt. Besonders daran war, dass dieser Effekt nur ausschließlich in exzitatorischen Synapsen nachgewiesen werden konnte, wohingegen die Situation in inhibitorischen Synapsen unverändert blieb. Diese Ergebnisse bestätigen erneut die Hypothese der Bedeutung von LPA für die Regulation der exzitatorische Transmission.

5 Diskussion

Das zentrale Nervensystem höherer Organismen ist hochkomplex und besteht aus einem gigantischen Netzwerk von Neuronen und Gliazellen. Nur ein in seiner Struktur und Funktion intaktes ZNS ist in der Lage, solch komplizierte Vorgänge wie das Denken, die Steuerung der Motorik oder Sensibilität zu gewährleisten. Um die korrekte Funktionsleistung des ZNS zu ermöglichen, wird die Entwicklung durch vielseitige molekulare Regulationsmechanismen kontrolliert. Zahlreiche Moleküle sind in diesen vielseitigen Mechanismen involviert.

So wurde in früheren Untersuchungen PRG1 identifiziert, ein Molekül, welches während der Entwicklung des ZNS eine regulierte Expression vorwies. Die ersten Analysen zeigten, dass dieses Protein zu der Superfamilie der Phosphatasen/Phosphotransferasen gehört [76]. Bei PRG1-defizienten Mäusen wurden spontane konvulsive Anfälle festgestellt [77]. Bis jetzt ist jedoch nichts über die intrazelluläre Lokalisation des Proteins bekannt. Um einen detaillierten Einblick in die subzelluläre Verteilung und das Vorhandensein des Proteins in verschiedenem Gewebe untersuchen zu können, sollte im Rahmen dieser Arbeit ein spezifisch gegen PRG1 gerichteter Antikörper aus Immuserum mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt werden.

5.1 PRG1 ist ein Gehirn- und Neuronen-spezifisches Protein

Für die biochemischen und immunocytochemischen Untersuchungen eines Proteins bedarf es eines spezifischen Antikörpers gegen das zu untersuchende Molekül. Zu Beginn der Arbeit waren bereits vier Antiseren vorhanden. Dabei handelte es sich um Seren aus Kaninchen, welche mit synthetischen Peptiden gegen zwei unterschiedliche Epitope im C-terminalen Bereich des PRG1-Proteins immunisiert waren. Da Antiseren ein Gemisch von Antikörpern beinhalten, können sie entsprechend an mehrere Epitope binden und eventuell zusätzlich unerwünschte Proteine detektieren. Das war auch bei den analysierten Seren gegen PRG1 der Fall, sodass eine Affinitätschromatographie zur Aufreinigung der Antikörper unumgänglich war.

Nach der Aufreinigung eines gegen PRG1 gerichteten Antikörpers konnte durch die in dieser Arbeit durchgeführten Tests im Immunblot die Spezifität des gewonnenen Antikörpers für das PRG1-Protein bewiesen werden. Der Antikörper zeigte im Proteinlysate einer PRG1-KO-

Maus keine PRG1-typische Bande und auch keine unspezifischen Banden, womit eindeutig bewiesen werden konnte, dass die Aufreinigung erfolgreich verlaufen ist.

Die Northern Blot-Analysen von A. Bräuer *et al.* (2003) der verschiedenen Gewebe zeigten mRNA-Transkripte von PRG1 ausschließlich im Gehirn und in den Hoden [76]. Die mit dem aufgereinigten Antikörper in dieser Arbeit durchgeführten Immunblot-Untersuchungen auf Proteinebene konnten diese Ergebnisse nicht vollständig bestätigen. Es wurde lediglich eine starke, dominante Bande für PRG1 im Gehirn gezeigt, in allen anderen Geweben war keine Detektion von PRG1 möglich. Die Diskrepanz dieser Ergebnisse lässt sich auf mehrere Ursachen zurückführen. Studien zu dieser Problematik belegen, dass die Menge der mRNA-Transkripte sich nicht immer linear zu der Menge des exprimierten Proteins verhält, sodass eine Korrelation zwischen diesen beiden Vorgängen sehr gering sein kann [152]. Weiterhin werden solche Diskrepanzen auf posttranskriptionale Modifizierungen und die Degradationsrate der mRNA zurückgeführt [153, 154]. Das könnte bedeuten, dass PRG1-mRNA in Hoden eine andere posttranskriptionale Modifizierung erfährt und dadurch nicht in das entsprechende PRG1-Protein translatiert wird oder dass das Protein eine geringere Halbwertszeit im Vergleich zum Protein im Gehirn besitzt. Es ist allerdings unwahrscheinlich, dass die Regulation im Hoden altersabhängig ist, denn für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden Organe aus den Stadien P5 und P30 verwendet, wobei in beiden Altersstadien ein identisches Ergebnis erzielt wurde (P30 Daten nicht gezeigt).

Der Nachweis für Neuronenspezifität für das PRG1-Protein wurde in dieser Arbeit mittels Immunblots erbracht. Hier konnte nur ein PRG1-Signal in Neuronen, jedoch nicht in Microglia oder Astrozyten, nachgewiesen werden. Ein zusätzlicher Nachweis der Neuronenspezifität von PRG1 wurde auf Proteinebene durch die Untersuchung heterologer Zelllinien neuronalen Ursprungs im Immunblot erbracht. Die Neuronenspezifität von PRG1-mRNA-Transkripten wurde zusätzlich in differenzierten embryonalen Stammzellen mittels qRT-PCR nachgewiesen.

5.2 PRG1-Expression während der Gehirnentwicklung der Maus

Um detailliertere Einblicke in das Expressionsmuster von PRG1 während der neuronalen Entwicklung zu erlangen, wurden Expressionsanalysen für den Hippocampus und Neocortex auf mRNA- und Protein-Ebene durchgeführt. Ein wichtiger Punkt für eine aussagekräftige Genexpressionsanalyse mittels quantitativer Real-Time-PCR ist die Effizienz der verwendeten Assays und die Auswahl geeigneter *Housekeeping Gene* (Referenzgene). Als ubiquitär exprimierte

Gene spielen sie in der Auswertung als Bezugsgröße eine wichtige Rolle und sollten aus diesem Grund möglichst keinen Schwankungen in der Expression zwischen den getesteten Entwicklungsstadien unterliegen. Zur Bestätigung der Richtigkeit der Ergebnisse wurden jeweils zwei verschiedene *Housekeeping Gene* in die Analyse einbezogen. Für die Untersuchungen im Rahmen der Entwicklungsstadien in dieser Arbeit waren die Gene der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) besonders gleichmäßig exprimiert und wurden daher für die Analysen eingesetzt. Die Auswertung der erhaltenen Daten zeigten bei beiden Referenzgenen stets konforme Ergebnisse.

Im Hippocampus und Neocortex konnten bereits am embryonalen Tag 16 (E16) PRG1-mRNA-Transkripte detektiert werden. Bräuer *et al.* beschrieben bereits 2003 eine zeitabhängige Regulation von PRG1 im Hippocampus mittels *in situ*-Hybridisierung und zeigten, dass die Expression dort erst an E19 beginnt [76]. Allerdings können die Analysen mittels *in situ*-Hybridisierung nur qualitative und semiquantitative Aussagen über die mRNA-Expression treffen. Die qRT-PCR wird im Vergleich dazu als sensitivere Methode angesehen. Diese Tatsache könnte den festgestellten Unterschied zwischen den Untersuchungen erklären.

Die mRNA-Niveaus von PRG1 hatten im Hippocampus am postnatalen Tag 10 (P10) und im Neocortex an P15 ihr Maximum erreicht. Diese Zeitspanne wird in der Fachliteratur als Phase der Synaptogenese beschrieben, in der auch die Integration von neu gebildeten Neuronen stattfindet [155]. In diesem Zeitraum ist die axonale Projektion unreifer Neurone entlang der Moosfaser in die CA3 (Cornu Ammonis) Region bereits abgeschlossen. Auch die Dendriten der Körnerzellen sind bereits in die molekulare Schicht eingewachsen [155].

Der Nachweis des PRG1-Proteins im Immunblot erfolgte im Hippocampus und Neocortex erst ab E19. Der festgestellte Stadienunterschied zwischen mRNA-Niveaus und PRG1-Protein liegt vermutlich daran, dass die mRNA-Synthese und Proteinexpression nicht in Korrelation zueinander stehen [152]. Insgesamt verifizierten die aus qRT-PCR und Immunblot gewonnenen Daten eine entwicklungsabhängige Regulation der PRG1-Expression im Hippocampus und Neocortex.

Im Cerebellum und Bulbus Olfactorius wurden die Analysen nur auf Proteinebene durchgeführt und zeigten auch hier eine immer stärkere Ausprägung der Bandenintensität um P5 bis P15. Diese Ergebnisse wurden ebenfalls durch die qRT-PCR-Analysen bestätigt (persönliche Kommunikation mit A. Soriguera Ferras). Es konnte festgestellt werden, dass die Expression des PRG1-Proteins im Cerebellum mit morphogenen Veränderungen wie neuronaler Proliferation,

Migration und Differenzierung sowie Synaptogenese einhergeht [156-158]. Im Bulbus olfactorius wird zum Zeitpunkt der maximalen PRG1-Expression die Migration der unreifen Neurone aus der subventrikulären Zone abgeschlossen und das Stadium der Synaptogenese beginnt [155].

Insgesamt konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals demonstriert werden, dass die Expression von PRG1 im Hippocampus, Neocortex, Cerebellum und Bulbus olfactorius während der embryonalen Entwicklung hochreguliert wird und die maximale Proteinmenge ca. zwei Wochen nach der Geburt, zum Zeitpunkt der Synaptogenese, erreicht wird.

Neben den Expressionsanalysen während der Gehirnentwicklung wurden die mRNA-Niveaus der PRG1-Transkripte in zu Neuronen differenzierten embryonalen Stammzellen untersucht. Die hier vorgestellten Daten zeigen, dass die Expression der PRG1-mRNA reguliert war und mit der Differenzierung der Zellen hin zu Neuronen zunahm.

5.3 Lokalisationsanalysen von PRG1 in primären hippocampalen Neuronen

In der 2009 publizierte Arbeit von Trimbuch *et al.* haben einige Daten, die auch Gegenstand dieser Arbeit waren, Einzug gefunden. Dort wurden die ersten Erkenntnisse bezüglich der postsynaptischen Lokalisation von PRG1 in glutamatergen Neuronen beschrieben [77]. Die Analysen erfolgten in hippocampalen Schnitten und konnten nur einen begrenzten Einblick in die subzelluläre Verteilung von PRG1 gewähren. Für einen detaillierten Einblick der intrazellulären PRG1-Lokalisation wurden parallel dazu in der hier vorliegenden Arbeit hippocampale Neurone in Kultur während verschiedener Differenzierungsstadien untersucht.

5.3.1 Subzelluläre Lokalisation von PRG1 in jungen Neuronen

Die immunocytochemischen Färbungen des endogenen PRG1 in unreifen Neuronen zeigten, dass das Protein stark in der Plasmamembran der Zellen angereichert war und im Soma nur ein schwaches Signal aufwies. Eine Gegenfärbung mit Tuj1 (Neuronen-spezifisches Klasse III β -Tubulin) bestätigte eine PRG1-Lokalisation in hippocampalen Neuronen und neuronalen Fortsätzen. Die Detektion im Zellkörper zeigt vermutlich das unreife PRG1, während seiner Synthese im endoplasmatischen Reticulum und/oder Golgi-Apparat. Eine Fokussierung auf die Wachstumskegel enthüllte eine lokale Anreicherung des endogenen PRG1 in diesen Strukturen. Die Wachstumskegel haben eine essentielle Funktion während der Navigation von unreifen Neuriten. Sie

besitzen eine sehr bewegliche Struktur, die durch zwei Arten von Cytoskelettelementen bestimmt wird. In der zentralen Region des Wachstumskegels, in der auch ein starkes PRG1-Signal nachgewiesen werden konnte, befinden sich überwiegend Mikrotubuli. Postuliert wird, dass in dieser Region Adhäsionsplaques lokalisiert sind, welche statischer sind als die periphereren Aktinfilamente [159]. In der peripheren Region herrschen Aktinfilamente vor, die die Dynamik der Wachstumskegel gewährleisten. Sie liegen in den fingerartigen Ausläufern, den sogenannten Filopodien, gebündelt vor und bilden in den Lamellipodien ein enges Netzwerk [160, 161]. Auch in diesen Strukturen war endogenes PRG1 vorhanden.

Kurze Zeit nach dem Ausplattieren der Kulturen bleiben die Neurone unpolarisiert. Eine Unterscheidung zwischen Axonen und Dendriten ist in diesem Stadium noch nicht möglich, da die Zellen erst undifferenzierte Neuriten gleicher Länge besitzen. Aufgrund der spezifischen Lokalisation von PRG1 kann angenommen werden, dass PRG1 während der Polarisierung der Neurone und in der Wegfindung auswachsender Axonen und/oder Dendriten *in vitro* eine Rolle spielt. Mehrere Arbeiten konnten bereits zeigen, dass Moleküle, welche an den Polarisationsmechanismen beteiligt sind, in den Spitzen der auswachsenden Neuriten lokalisiert sind, wie es auch bei PRG1 der Fall war. So wurde auch Phosphoinositol-3-Kinase-Aktivität (PI3K) und eine lokale Anreicherung des Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃) an den Spitzen der Neuriten vorgefunden, wo sie eine wichtige Rolle während der axonalen Differenzierung und Elongation spielen [162-164]. Eine weitere Bestätigung der Annahme könnten die Befunde von Bräuer *et al.* (2003) sein, welche zeigten, dass PRG1 nach einer enthorinalen Cortexläsion auf wiederausprossenden Axonen lokalisiert war [76, 214].

Aus morphologisch zunächst nicht zu unterscheidenden Neuriten wächst ein Fortsatz kontinuierlich aus und differenziert sich zum Axon. Aus den verbleibenden Fortsätzen entwickeln sich wenige Tage später die Dendriten [119]. In Neuronen nach 4 Tagen *in vitro* können Axonen und Dendriten bereits durch spezifische Markerproteine visualisiert werden. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass sich bei diesen Zellen die Lokalisation von PRG1 im Vergleich zu der in jüngeren Neuronen nicht verändert. Die Detektion des Proteins konnte gleichermaßen in der Membran der Axonen und Dendriten festgestellt werden. Das lässt vermuten, dass eine mögliche Funktion von PRG1 bei der Regulation der Wegfindung und Motilität der neuronalen Fortsätze nicht spezifisch auf Axonen oder Dendriten festgelegt ist.

Das Auswachsen von unreifen Fortsätzen zu Axonen und Dendriten wird nicht nur durch intrinsische, sondern auch durch extrinsische Faktoren streng reguliert [165-167, 215]. So konnte

unter anderem die Lysophosphatidsäure (LPA) als ein repulsiv wirkender Faktor identifiziert werden, welcher bei mehreren neuronalen Zelllinien wie N1E-115, PC12 und SY-SH5Y zu einem Wachstumskegel-Kollaps und zur Retraktion der Neuriten über Rho-abhängige und Rho-unabhängige Signalkaskaden führt [4, 22, 61, 62]. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Überexpression von PRG1 in N1E-115-Zellen eine LPA-induzierte Neuritenretraktion verhindern konnte [76]. Diese Tatsache und die spezifische Lokalisation von PRG1 in den Microtubuli und aktinreichen Bereichen der Neurone bekräftigen die Hypothese, dass PRG1 an der Reorganisation oder Stabilisierung des Cytoskeletts mitwirken könnte.

Aufgrund der in dieser vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen der Lokalisation von PRG1 in jungen, hippocampalen Neuronen *in vitro* kann davon ausgegangen werden, dass PRG1 in unreifen Neuronen eine Rolle in den Prozessen der Wegfindung und/oder dem Auswachsen der Neuriten spielen könnte. Die homogene Verteilung des Proteins in der Zellmembran der Neurone nach 4 Tagen *in vitro* zeigt, dass eine Mitwirkung von PRG1 bei der axonalen Differenzierung unwahrscheinlich ist. In so einem Fall wäre die Lokalisation von PRG1 spezifisch auf Axone und Wachstumskegel begrenzt, wie sie bei den Proteinen wie Akt oder Glykogen Synthase Kinase-3-beta (GSK-3 β) beschrieben wird [168, 169]. Die gepunktete Verteilung von PRG1 in der Membran der Wachstumskegel junger Neurone reflektiert eine Beteiligung an Reorganisation der Zellmembran und Neuritenwachstum. Solche Verteilungsmuster wurden schon bei anderen, an solchen Prozessen beteiligten Proteinen wie Neuropilin oder Netrin-Rezeptoren beobachtet [170, 171].

5.3.2 Subzelluläre Lokalisation von PRG1 in reifen Neuronen

Nach 7 Tagen in Kultur sind hippocampale Neurone *in vitro* sowohl strukturell als auch funktionell polarisiert, besitzen ein einziges Axon und mehrere Dendriten. Auch in diesem Stadium zeigte das endogene PRG1 in den vorliegenden Untersuchungen ein kräftiges Fluoreszenzsignal. Auffallend war eine zunehmend polarisierte Lokalisation von PRG1 während der neuronalen Differenzierung. PRG1 konnte in diesem Stadium stets stark angereichert in den Dendriten beobachtet werden, wohingegen im Axon ein schwächeres Signal detektiert wurde.

In Neuronen nach 14 Tagen *in vitro* war dieses polarisierte Lokalisationsmuster noch deutlicher zu erkennen. Das PRG1 war stark in den Dendriten und besonders in den dendritischen Spines, welche aus dem Schaft der Dendriten hervorragen, vorhanden. Die Entwicklung des

Dendritenbaumes ist ein hochdynamischer Prozess, der sowohl durch aktivitätsunabhängige als auch durch aktivitätsabhängige intrinsische und extrinsische Signale reguliert wird [172]. Zu den intrazellulären Faktoren gehören unter anderem die Rho-GTPasen, wobei die Familienmitglieder RhoA (*Ras homologous member A*), Cdc42 (*cell division cycle 42*) und Rac1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) am besten charakterisiert sind [173]. Seit Jahren ist bekannt, dass RhoA, Rac1 und Cdc42 durch die Regulation des Aktincytoskeletts die Dendritenbildung stimulieren oder hemmen [174, 175]. Es könnte sein, dass PRG1 in der Regulation der Dendriten- und/oder Spinogenese involviert ist.

Der genaue Zeitpunkt der PRG1-Lokalisationsveränderung zwischen Axonen und Dendriten ist nur schwierig zu bestimmen. Zum einen unterliegen nicht alle Neurone in Kultur exakt dem gleichen Differenzierungsstadium, zum anderen ist die Halbwertszeit des Proteins ein entscheidender Faktor für die verbleibende Lokalisation in der Membran des Axons [118]. Insgesamt deuten die vorgestellten Daten zur PRG1-Lokalisation in Neuronen darauf hin, dass PRG1 an Prozessen, welche mit Neuritenwachstum, Polarisation oder Zellmigration assoziiert sind, beteiligt sein könnte.

5.3.3 *PRG1 ist ein postsynaptisches Protein*

Detailliertere Analysen der PRG1-Lokalisation in postsynaptischen Terminalien erfolgten immunocytochemisch in hippocampalen Neuronen nach 14 Tagen *in vitro*. Die Doppelfärbung von endogenem PRG1 und PSD-95 (*postsynaptic density-95*) zeigte teilweise eine Kollokalisation beider Signale. Die postsynaptische Dichte befindet sich am Kopf der Spines und stellt ein komplexes Protein-Netzwerk dar, das in den dendritischen Dornen mit der postsynaptischen Membran verknüpft ist [176]. Sie bietet eine Art Plattform für verschiedene funktionelle und rezeptorassoziierte Proteine, die miteinander interagieren. In der PSD sind Rezeptoren, Adhäsionsmoleküle, Struktur- und cytoskelettale Proteine sowie Enzyme vertreten, die unter anderem an der Strukturbildung und Signalprozessierung beteiligt sind [177]. Die beobachtete PRG1-Lokalisation liefert einen weiteren Hinweis, dass dieses Protein bei der Stabilisierung und Organisation des Cytoskeletts dendritischer Spines eine Rolle spielen könnte. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass PRG1 auch an der Maschinerie der Signalprozessierung beteiligt ist. Neuesten immunhistochemischen Untersuchungen an hippocampalen Schnitten zufolge ist PRG1 mit ProSAP2 und Homer1 kollokalisiert; Proteine, welche spezifisch in und um die PSD lokalisiert sind [77]. Interessanter-

weise handelt es sich dabei um Proteine, welche nur in glutamatergen Neuronen vorkommen [77, 178, 179]. Es konnte keine Überlagerung der Signale von PRG1 und Gephyrin, einem Marker der postsynaptischen GABAergen Kontakte, gezeigt werden. Die elektronenmikroskopische Analyse bestätigte dies. Hier konnte gezeigt werden, dass PRG1 ausschließlich in der Membran von asymmetrischen (glutamatergen) und nicht in symmetrischen (GABAergen) Synapsen lokalisiert ist [77].

Für den Fall, dass PRG1 tatsächlich an der Differenzierung von Dendritenbäumen und/oder der Spinogenese beteiligt sein sollte, stellt sich nun die Frage, warum dieses Protein Zellsubtyp-spezifisch nur in glutamatergen Neuronen exprimiert wird. PRG1-defiziente glutamaterge CA1-Neurone wiesen eine höhere glutamaterge Transmission in Form einer spontanen Vesikelfreisetzungsfähigkeit (mEPSC) auf als Wildtyp-Neurone, wohingegen die GABAergen PRG1-KO-Neurone keine Veränderungen zeigten [77]. Diese Befunde weisen darauf hin, dass PRG1 aufgrund seiner spezifischen Lokalisation in der glutamatergen Postsynapse in exzitatorische Signalweiterleitungen regulierend eingreifen könnte.

5.4 Expressions- und Lokalisationsanalysen der LPA-Rezeptoren

5.4.1 *Quantitative Expressionsanalysen während der Entwicklung des ZNS*

Um die Expression von fünf bekannten LPA-Rezeptoren im zentralen Nervensystem zu analysieren, wurden bis jetzt mehrere Untersuchungen unternommen. Dabei wurden unterschiedliche Stadien und Methoden wie *in situ*-Hybridisierung und Northern Blot angewandt [4-6, 53, 69, 180-182]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zum ersten Mal Expressionsanalysen der LPA-Rezeptoren auf mRNA-Ebene während der neuronalen Entwicklung zwischen E14 und P30 detailliert durch Anwendung einer modernen und sensitiven Methode, der quantitativen Real-Time-PCR bestimmt.

In allen für die Analysen eingesetzten Hirnregionen wie dem Hippocampus, Neocortex, Cerebellum und Bulbus olfactorius konnte eine Expression der LPA1-, LPA2- und LPA4-Transkripte nachgewiesen werden.

Die Expression des LPA1-Rezeptors blieb im Hippocampus und Neocortex während des Entwicklungszeitraumes relativ stabil und zeigte nur eine geringe Regulation. Die höchste Ex-

pression des LPA1-Rezeptors wurde im Neocortex im Stadium E14 und E16 beobachtet. Dieses Ergebnis stimmt überein mit publizierten Daten, die beschreiben, dass der LPA1-Rezeptor zu diesem Zeitpunkt der embryonalen Entwicklung in der ventrikulären Zone stark exprimiert wird [5]. Ein bereits beschriebener Phänotyp der LPA1-KO-Mäuse ist eine verringerte Gehirnmasse und die Málaga-Variante (entstand durch spontane und stabile Kreuzung der LPA1-KO-Rasse) zeigte sogar einen Defekt der corticalen Entwicklung und einen gehäuften Zelltod im Neocortex [17, 37]. Im Cerebellum konnte eine Hochregulation der Rezeptorexpression kurz nach der Geburt registriert werden. Im Bulbus olfactorius dagegen waren die mRNA-Niveaus in den embryonalen Stadien, besonders um E19, hoch und zeigten eine postnatale Herunterregulation. In frühen Stadien der olfaktorischen Entwicklung finden Prozesse wie Neurogenese und Anfänge der Migration von unreifen Neuronen aus der subventrikulären Zone über den rostralen Migrationsstrom zum Bulbus olfactorius statt [155]. Die hohen mRNA-Niveaus in frühen Entwicklungsstadien des Bulbus olfaktorius unterstreichen erneut die Funktion des LPA1-Rezeptors und erklären eventuell den Phänotyp der LPA1-defizienten-Mäuse, welche einen gestörten Saugreflex aufweisen [37]. Diese Daten stehen im Einklang zu den hier beschriebenen qRT-PCR-Ergebnissen bezüglich einer hohen und stabilen Expression des Rezeptors während der Neurogenese.

Die mRNA-Niveaus des LPA2-Rezeptors waren im Hippocampus genauso stark und kaum reguliert wie die des LPA1-Rezeptors. Im Neocortex, Cerebellum und Bulbus olfactorius nahm die Menge der mRNA-Transkripte des LPA2-Rezeptors um P10 ab. Auffallend war, dass im Bulbus olfactorius die LPA2- und 4-Rezeptoren an P30 4-fach geringer im Vergleich zu LPA1 exprimiert wurden. Die LPA2-KO-Mäuse weisen keine phänotypischen Anomalien auf und die LPA1/2-doppel-KO-Mäuse besitzen keinen weiteren Phänotyp zusätzlich zu dem von LPA1-KO. Die LPA1- und 2-Rezeptoren modulieren exakt die gleiche Signalkaskade nach ihrer Aktivierung [3, 50, 183]. Aufgrund dieser Tatsache sind derzeit die physiologischen Funktionen der einzelnen LPA-Rezeptoren noch nicht vollständig aufgeklärt [69]. Durch die in dieser Arbeit gezeigten Analysen ist jedoch anzunehmen, dass LPA2 aufgrund seiner hohen Expression während der Entwicklung des Gehirns und besonders im Hippocampus auch im adulten Stadium eine wichtige Rolle spielen müsste.

Der LPA4-Rezeptor war in allen getesteten Hirnarealen insgesamt schwächer exprimiert als die Rezeptoren 1 und 2. In Analysen anderer Arbeitsgruppen mittels qRT-PCR konnte eine hohe Expression des Rezeptors in humanen Ovarien nachgewiesen werden [53]. Obwohl LPA4-defiziente Mäuse keine offensichtlichen Anomalien aufweisen, reagieren die LPA4-defizienten

Maus-Embryonenfibroblasten (MEF) mit verstärkter, LPA-induzierter Migration. Aufgrund dieser Tatsache nehmen die Autoren an, dass der LPA4-Rezeptor in den Prozessen der Migration und Invasion agiert [74], was auch eine höhere Expression während der Entwicklungsstadien erklären könnte.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsstudien konnten in keinem Stadium in den verwendeten Hirnregionen mRNA-Transkripte für die LPA3- und 5-Rezeptoren nachweisen. Die Effizienz der verwendeten Assays wurde vor dem Einsatz mit einer cDNA aus der Milz, einem Organ, in dem bereits eine Expression der LPA3- und LPA5-Rezeptoren beschrieben wurde [54, 69], überprüft. Sie lag bei 97-100 %. Auf diese Weise konnte sichergestellt werden, dass die mRNA-Menge der Rezeptoren im Gehirn tatsächlich unter dem Detektionslevel lag und das Ergebnis nicht Folge einer fehlerhaften Durchführung des Experiments war. Die Arbeitsgruppe um Contos konnte allerdings eine LPA3-Expression mittels Northern Blots im Gehirn nachweisen [3]. Die Diskrepanz der publizierten Daten kann mehrere Ursachen haben: Die Publikation zeigt zum einen einen Blot mit aufgetragener gesamt-RNA aus adultem Mäusehirn, in dem kein LPA3 detektiert wurde und zusätzlich einen anderen Blot, auf dem Hirn-total-RNA aus mehreren Entwicklungsstadien aufgetragen wurde, der dann eine schwache Bande im P7-Stadium zeigt. Eine qRT-PCR-Analyse weist eine hohe Reproduzierbarkeit, hohe Sensitivität und geringe Varianzen der Ergebnisse auf, sodass von der Richtigkeit der Ergebnisse ausgegangen werden kann. Die hier vorgestellten Daten für den LPA5-Rezeptor konnten die publizierten Daten von Lee *et al.* (2006) die ebenfalls keine LPA5-Rezeptor-Transkripte mittels Northern Blot im Gehirn nachweisen konnten, verifizieren [54].

5.4.2 Subzelluläre Lokalisation endogener LPA1- und 2-Rezeptoren in unreifen primären Neuronen

In jungen hippocampalen Neuronen wurden mangels spezifischen Antikörpers für den LPA4-Rezeptor (Daten nicht gezeigt) und mangels detektierbarer mRNA-Transkripte für den LPA3- und 5-Rezeptor keine subzellulären Lokalisationsanalysen durchgeführt.

Untersuchungen an kultivierten Neuronen nach 2 Tagen *in vitro* zeigten, dass sowohl der LPA1- als auch der LPA2-Rezeptor in der Plasmamembran der Neurone *in vitro* lokalisiert waren. Als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit vielseitigen und identischen Signalkaskaden sind diese beiden Rezeptoren an mehreren zellulären Vorgängen beteiligt. In neuronalen Zelllinien

wurde diesen Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Migration, Reorganisation der Aktinfilamente und Neuritenretraktion zugeschrieben (zur Übersicht siehe [184]). Solche Abläufe sind auch für die Differenzierung von Neuronen und die Ausbildung des neuronalen Netzwerkes unumgänglich. Interessant ist, dass beide Rezeptoren, welche in der Lage sind, die gleichen G-Proteine zu binden und demnach identische Signalkaskaden auslösen, in gleicher Menge, wie in dieser Arbeit mittels qRT-PCR gezeigt, in 2 Tage kultivierten Neuronen exprimiert werden. Dies könnte eventuell durch den festgestellten Lokalisationsunterschied im Wachstumskegel erklärt werden. Während der LPA1-Rezeptor überwiegend in aktinreichen Filopodien und Lamellipodien detektiert wurde, wurde der LPA2-Rezeptor hauptsächlich in den peripheren Bereichen des Wachstumskegels gezeigt.

In 4 Tage kultivierten Neuronen wurden der LPA1- und LPA-2-Rezeptor in Somata, Dendriten und Axonen detektiert. Auffallend war, dass der LPA1-Rezeptor in den aktinreichen Filopodien und Lamellipodien, aber auch stark im peripheren Bereich des Wachstumskegels, kolokalisiert mit neuronalem Tubulin, nachgewiesen wurde. Der LPA2-Rezeptor, der in 2 Tage kultivierten Neuronen im peripheren Bereich des Wachstumskegels detektiert wurde, zeigte in 4 Tage kultivierten Neuronen kaum ein Signal in diesem Bereich, wurde dafür aber in Dendriten und Axonen nachgewiesen.

Reaktionen wie Wachstumskegelskollaps und Neuritenretraktion auf repulsive Faktoren wie LPA sind unerlässlich, um eine korrekte Ausbildung neuronaler Verbindungen während der Entwicklung des Nervensystems zu erreichen. Die Verteilung des endogenen LPA1-Rezeptors wurde in 2 und 4 Tage kultivierten Neuronen in den Endspitzen der Neuriten und dem Zellkörper festgestellt. Ebenso wird die Expression der GSK-3 β in diesen Stadien der neuronalen Polarisation beschrieben [118]. GSK-3 β verhindert in ihrer aktivierten Form die Verzweigung von Neuriten, indem sie durch Phosphorylierung der Microtubuli-bindenden Proteine wie Tau, CRMP-2, APC und MAP1B die Microtubuli-Dynamik reguliert [185]. Studien an der neuronalen Zelllinie SY-SH5Y zeigten, dass der LPA1-Rezeptor Signalkaskaden aktiviert, welche zuerst die Calcium-abhängige Tyrosinkinase Pyk2 aktivieren und anschließend die Tyrosin-Phosphorylierung der GSK-3 β hervorrufen. Die folgende Phosphorylierung von Tau, einem axonalen Microtubuli-Protein, erklärt die LPA-induzierte Neuritenretraktion [19, 186]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Rezeptoren LPA1 und 2 in *Xenopus* für die Aggregation des corticalen Aktins *in vivo* verantwortlich sind [187, 188]. Die Kombination der in dieser Arbeit vorgestellten Daten lässt

darauf schließen, dass die LPA1- und 2-Rezeptoren auch in hippocampalen Neuronen solche Prozesse regulieren könnten.

5.4.3 Subzelluläre Lokalisation endogener LPA1- und 2-Rezeptoren in reifer Neuronenkultur

In hippocampalen Neuronen nach 14 Tagen *in vitro* konnte der LPA1-Rezeptor immunocytochemisch nicht mehr detektiert werden. So wird angenommen, dass die Rolle dieses Rezeptors ausschließlich auf die Stadien der Differenzierung der Neurone und der damit verknüpften molekularen Mechanismen begrenzt ist. Die immunocytochemischen Analysen zeigten eine intensive Färbung des endogenen LPA1-Rezeptors in Gliazellen. Die Expressionsstudien mittels qRT-PCR zeigten hohe mRNA-Niveaus für den LPA1-Rezeptor in kultivierten Astrozyten. Diese Entdeckung ist konform zu den Daten von Tabuchi *et al.* (2000), welche eine Expression des LPA1-Rezeptors in kultivierten murinen Astrozyten mittels *in situ*-Hybridisierung nachgewiesen haben [189].

In reifer Neuronenkultur ließ sich ein um 7-fach höheres Niveau der mRNA-Transkripte für den LPA2-Rezeptor, im Vergleich zum LPA1-Rezeptor, feststellen. Die immunocytochemische Färbungen wiesen eine homogene Verteilung des LPA2-Rezeptors in den Axonen, Dendriten und im Somata der Neurone auf. Aufgrund des Expressionsmusters, gezeigt durch qRT-PCR und subzelluläre Verteilung, lässt sich vermuten, dass der LPA2-Rezeptor an den Prozessen der kontinuierlichen Reifung von Dendriten und Axonen und an der Ausbildung des neuronalen Netzwerkes und/oder an der Ausbildung dendritischer Dornen und der Synaptogenese beteiligt sein könnte.

5.5 LPA-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung in hippocampalen Neuronen

5.5.1 Der LPA2-Rezeptor vermittelt die Ca^{2+} -Freisetzung in Neuronen

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Daten zeigen eine durch LPA-Applikation induzierte transiente Ca^{2+} -Freisetzung in Neuronen. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass dieser Effekt über eine spezifische Aktivierung des LPA2-Rezeptors erfolgt.

In mehreren neuronalen und nicht neuronalen Zelllinien wurde bereits gezeigt, dass LPA in der Lage ist, eine Erhöhung des freien Calciums im Cytoplasma auszulösen [11, 35, 52, 190, 191]. Im Rahmen dieser Arbeit sollten primäre hippocampale Neurone für die Analysen eingesetzt werden, denn primäre Neurone sind als Modell ihres physiologischen Vorbilds besser geeignet als Zelllinien.

Nachdem die primären Neurone einen LPA-induzierten cytoplasmatischen Ca^{2+} -Anstieg zeigten, stellte sich die Frage, welche LPA-Rezeptoren für diese Reaktion verantwortlich sind und welche intrazellulären Signalkaskaden dieser Reaktion zu Grunde liegen. Der Effekt könnte auf LPA1-, 2- und 4-Rezeptoren zurückzuführen sein, denn in dieser Arbeit wurde nur das Vorhandensein für diese Rezeptoren in Neuronen, welche für die Calciummessungen verwendet wurden, nachgewiesen. Jeder dieser Rezeptoren wäre aufgrund seiner Bindung an G_q - und/oder G_i -Proteine in der Lage, die Phospholipase C (PLC) und eine anschließende Aktivierung des Inositol-1,4,5-triphosphat-(IP_3)-Rezeptors in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ERs) mit resultierender Ca^{2+} -Freisetzung zu vermitteln. Für die Untersuchung der intrazellulären Signalkaskaden, welche zu einem LPA-induzierten Ca^{2+} -Anstieg führen, wurde eine LPA-Konzentration von 10 μM verwendet. Diese Konzentration wurde aus folgenden Gründen gewählt: Zum einen konnten in den Vorversuchen Calciumtransienten mit dieser Konzentration in Neuronen gemessen werden. Zum anderen entspricht die Konzentration der physiologischen Menge von LPA im Serum und wird in der Literatur oft beschrieben und eingesetzt. Darüber hinaus können höhere LPA-Konzentrationen zu Nekrose in primären hippocampalen Neuronen führen [192].

Die Frage nach dem involvierten Rezeptor wurde durch Anwendung unterschiedlicher Ansätze untersucht. Die Tatsache, dass in primären Neuronen nach 7 Tagen *in vitro* hauptsächlich die mRNA-Transkripte des LPA2-Rezeptors detektiert wurden, ließ vermuten, dass dieser Rezeptor der Gesuchte war. Dies ließ sich durch den Einsatz primärer hippocampaler Neuronen aus einer LPA2-KO-Maus bestätigen. Die LPA2-defizienten Neurone zeigten keine Calciumtransienten als Reaktion auf einen LPA-Stimulus.

5.5.2 LPA-induzierte Aktivierung des IP_3 -Rezeptors wird über das G_i -Protein vermittelt

Für die Mobilisierung des Calciums kamen verschiedene Wege der LPA-aktivierten intrazellulären Signalkaskaden in Frage. Es war nicht klar, ob das Calcium aus den zellulären Spei-

chern oder aus dem extrazellulären Milieu als Folge einer Aktivierung der spannungsabhängigen Calciumkanäle stammte. Diese Fragestellung wurde durch Einsatz verschiedener Pharmaka geklärt. Der LPA2-Rezeptor kann nach seiner Aktivierung durch LPA sowohl G_q - als auch G_i -Proteine binden, was in beiden Fällen zu einer Calciumfreisetzung führt [3, 50, 193]. Der Einsatz eines bekannten Inhibitors, Pertussistoxin (PTX), welcher die α -Untereinheit des G_i -Proteins spezifisch blockiert, sollte Klarheit über das beteiligte G-Protein bringen [134]. In der Tat konnten nach Anwendung des Inhibitors keine LPA-induzierten Calciumtransienten mehr gemessen werden. Da es keinen kommerziell erhältlichen Blocker für das G_q -Protein gibt, konnte diese Beobachtung nur einseitig bestätigt und nicht zusätzlich durch eine Blockade des G_q -Proteins kontrolliert werden. Weiterhin wurde in dieser Arbeit durch den Einsatz der pharmakologischen Inhibitoren U-73112 und U-73343 der Beweis erbracht, dass die Aktivierung der PLC für die Freisetzung von Calcium als eine LPA-hervorgerufene Reaktion unumgänglich ist [136]. Die PLC ist für die Synthese von Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat verantwortlich. Im Folgenden aktiviert IP_3 den ligandengesteuerten IP_3 -Rezeptor in der Membran des ERs. Nach der Bindung von IP_3 an den Rezeptor wird dieser geöffnet, was zu einer schnellen Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem ER und damit zu einem Anstieg der cytoplasmatischen Calcium-Konzentration führt. Da eine Inhibierung der PLC zu einer Unterdrückung von Calcium und die Verwendung des PLC-Antagonisten U-73343 zu einer Calciumantwort innerhalb der Zelle führte, kann vermutet werden, dass das Calcium, welches nach der Stimulation mit LPA intrazellulär zunahm, aus den Speichern des ERs stammt. Diese Schlussfolgerung wurde durch Einsatz von Xestospongin C (XeC) und Thapsigargin (Thg) endgültig bestätigt. XeC ist ein spezifischer Blocker des IP_3 -Rezeptors, Thg ist ein irreversibler Inhibitor der Ca^{2+} -ATPase. Die Ca^{2+} -ATPase ist für die Wiederauffüllung des ERs mit Ca^{2+} -Ionen zuständig und entleert gleichzeitig die Speicher [137-141]. Wenn es sich um Calcium aus dem ER handelt, darf daher nach dem Einsatz der Blocker kein Anstieg mehr detektiert werden. In der Tat zeigten die generierten Daten, dass es sich beim vermehrten, intrazellulären Calcium nach LPA-Stimulus um Calcium aus dem ER handelte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es im Rahmen dieser Arbeit gelungen war die Signalwege, welche nach der Bindung von LPA an den LPA2-Rezeptor aktiviert werden und an der Freisetzung des gespeicherten Calciums aus dem ER beteiligt sind, durch den Einsatz verschiedener pharmakologischer Substanzen zu entschlüsseln.

5.5.3 LPA-induziert einen Calciumanstieg in präsynaptischen Terminalien

Hier präsentierten Ergebnisse dokumentieren, dass der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration auf die Öffnung der IP₃-Rezeptoren des ERs zurückzuführen ist. Dennoch stellt sich die Frage, ob die spannungsgesteuerten Calciumkanäle an diesen Prozessen gänzlich unbeteiligt oder eventuell ebenfalls involviert sind.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass es durch die Blockade der P/Q-Typ-Kanäle mit dem bekannten Inhibitor ω -Agatoxin-TK [142, 143] zu einer reduzierten Calciumantwort nach einem LPA-Stimulus kam. Bei Inhibition der N-Typ-Kanäle mit ω -Conotoxin-GVIA [145] wurde ebenfalls eine Reduktion der LPA-vermittelten Calciumantwort beobachtet. Diese Ergebnisse standen nicht im Einklang mit den durchgeführten Analysen zur Aufklärung der intrazellulären Signalkaskaden. Wenn der LPA-induzierte Calciumanstieg im Cytosol auf die Öffnung des IP₃-Rezeptors zurückzuführen sein sollte, stellt sich die Frage, warum eine Verminderung des Signals nach Inhibition der Calciumkanäle festgestellt werden konnte. Sowohl die P/Q- als auch die N-Typ-Kanäle werden in erster Linie in präsynaptischen Nervenendigungen nachgewiesen, in denen ihre Öffnung für eine schnelle Freisetzung der Neurotransmitter verantwortlich ist. Ihre Lokalisation wurde aber auch in der Membran des Zellkörpers beschrieben [91, 92]. Die Messungen des intrazellulären Calciums erfolgten direkt am Zellkörper. Durch die LPA2-Rezeptor-vermittelte Aktivierung der PLC könnte es demzufolge zur intrazellulären Produktion von DAG und IP₃ kommen. In Folge dessen führt das DAG zur Aktivierung der Proteinkinase C und zur Öffnung der spannungsgesteuerten Calciumkanäle. IP₃ öffnet die IP₃-Rezeptoren, was ebenfalls einen Calcium-Einstrom in die Zelle zur Folge hat (zur Übersicht siehe [194]). Eine verschiedene Dichte der beiden Kanal-Typen auf der somatischen Membran könnte diese geringen Unterschiede der Calciumtransienten erklären.

Bei L-Typ-Kanälen handelt es sich um Kanäle, welche hauptsächlich in Muskelzellen oder Dendriten eines Neurons exprimiert und als Kontrolle betrachtet werden [195]. Die R-Typ-Kanäle werden in Neuronen exprimiert. Für diesen Typ wird ebenfalls angenommen, dass er möglicherweise an der Neurotransmitterfreisetzung beteiligt sein könnte. Diese Annahme wurde jedoch noch nicht vollständig bestätigt [196]. Eine Inhibition der L- und R-Typ-Kanäle bewirkte keine Veränderung in LPA-induzierten Reaktionen im Hinblick auf die ausgelösten Calciumtransienten.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse ließen vermuten, dass LPA womöglich nicht nur zu einem somatischen Calciumanstieg führt, sondern auch zu einem Calciumanstieg direkt in der Präsynapse. Wie in dieser Arbeit gezeigt, wird der Calciumanstieg in Neuronen über den LPA2-Rezeptor vermittelt. Es wurde auch gezeigt, dass dieser Rezeptor eine homologe Verteilung innerhalb eines Neurons aufweist, sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass LPA eventuell an der Neurotransmitterfreisetzung beteiligt ist. Solche LPA-Effekte wurden bereits an PC12-Zellen beobachtet, in welchen LPA zu einer Dopaminfreisetzung führt [35].

Calciummessungen in den präsynaptischen Terminalien zeigten einen lokalen, LPA-induzierten Anstieg der Calciumkonzentrationen. Wie es scheint, wirkt die Aktivierung des LPA2-Rezeptors nicht inhibierend auf die P/Q- und/oder N-Typ-Kanäle, wie es für andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, z. B. für inhibitorisch wirkende Opioid-, GABA_B-, Serotonin-, oder Androgene-Rezeptor, bereits beschrieben wurde [197-199].

5.5.4 LPA steuert die Freisetzung der synaptischen Vesikel in primären hippocampalen Neuronen

Die bisher im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Calciummessungen lieferten Hinweise darauf, dass LPA möglicherweise in den Zyklus der synaptischen Vesikel eingreifen könnte. Diese Hypothese entstand durch den Einsatz von pharmakologischen Inhibitoren der präsynaptischen Calciumkanäle des P/Q- und N-Typus, nachdem verringerte Calciumtransienten gemessen wurden. Unter Verwendung der SynaptopHluorin-Methode war es möglich, diese Hypothese in primärer hippocampaler Zellkultur *in vitro* zu studieren. Diese optische Methode wurde entwickelt um die präsynaptische Aktivität und den Vesikelzyklus untersuchen zu können und wird heute im Vergleich zu elektrophysiologischen Methoden, für die die kleinen Synapsen unzugänglich sind, bevorzugt verwendet [200-202]. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass LPA eine Exozytose der synaptischen Vesikel auslöst. Eine Kontrolle mit Neuronen aus einer LPA2-KO-Maus bestätigte dieses Ergebnis und zeigte erneut, dass der induzierte Effekt exklusiv über den LPA2-Rezeptor in hippocampalen Neuronen vermittelt wird.

Die Fluoreszenzleuchtdauer nach einer LPA-Applikation erschien jedoch zu lang, denn in der Literatur wird die saure Hydrolyse eines Vesikels nach Endozytose als ein sehr schneller Prozess beschrieben und besitzt eine Zeitkonstante (τ) von 4-5 sek [82]. Andere Arbeiten konnten allerdings für die saure Hydrolyse der SynaptopHluorin enthaltenden Vesikel nach einer elektri-

schen Stimulation von 30 sek (10 Hertz/sek) eine Zeitkonstante von $\tau = 40-80$ sek bestimmen [202, 203]. Für die LPA-induzierte Exozytose wurde ebenfalls eine Zeitkonstante ermittelt, die bei 122 sek lag. Für die Kontrolle mit L-Glutamat betrug die Fluoreszenzleuchtdauer $\tau = 43$ sek. Der Vorteil der angewandten Methode unter den durchgeführten Bedingungen war, dass eine Vesikel-Exozytose und -Endozytose in Echtzeit untersucht werden konnte, ohne dass die präsynaptische Funktion beeinflusst wurde. Ein Nachteil ist, dass es nicht möglich war, zu unterscheiden, ob nur ein oder mehrere Vesikel mit der Plasmamembran fusionierten. Es könnte dadurch zu verfälschten Ergebnissen gekommen sein, denn es war nicht klar, ob die lange Fluoreszenzleuchtdauer auf ein geöffnetes Vesikel zurückzuführen war oder ob weitere Vesikel bereits fusionierten, bevor das erste Vesikel angesäuert werden konnte. In der Literatur werden Untersuchungen angeführt, die eine Stimulation der Neurone durch einen elektrischen Impuls beschreiben, durch den alle Vesikel gleichzeitig reagieren. In dieser Arbeit wurde aber eine physiologische Stimulation angewandt. Eventuell könnte dies der Grund für die langsame Endozytose sein. Trotz dieser Beobachtung ist allerdings nicht zu vernachlässigen, dass LPA-stimulierte Vesikel fast 3 Mal so viel Zeit benötigten um angesäuert zu werden als die L-Glutamat stimulierten Vesikel. Dieses Phänomen könnte unterschiedliche Ursachen haben. Sowohl LPA als auch Glutamat binden an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Bei den Glutamatrezeptoren handelt es sich unter anderem um Ionen-Kanäle die auch Calcium passieren lassen können. Das könnte eventuell bedeuten, dass nach einem Glutamat-Stimulus die Vesikel an der aktiven Zone direkt mit der Membran fusionieren und eine schnelle Endozytose durchlaufen. LPA dagegen führt zuerst zu einer Aktivierung der intrazellulären Signalkaskaden, um eine Fusion der Vesikel auslösen zu können. Die LPA-stimulierten Vesikel könnten folglich nach und nach fusionieren oder möglicherweise aus dem „slowly releasable pool“ stammen, aus dem sie mit einer Zeitkonstante von etwa 3 Vesikel/sek fusionieren, während die Vesikel im „readily releasable pool“ mit einer zehnfach schnelleren Zeitkonstante (30 Vesikel/sek) fusionieren [94].

5.6 LPA wirkt ausschließlich auf glutamaterge Neurone

An der chemischen Synapse löst ein Calciumeinstrom in die Terminalien eine Ausschüttung der Neurotransmitter aus den präsynaptischen Vesikel aus. Eine Aktivierung der präsynaptischen Rezeptoren löst eine komplexe Signalkaskade in den Nervenendigungen aus und bewirkt über den PLC/DAG-Signalweg eine Sekretion der synaptischen Vesikel [204-207]. Der LPA2-

Rezeptor ist ebenfalls in der Lage, die PLC zu aktivieren und auf diesem Weg zur Freisetzung der Vesikel beizutragen. Dafür wäre es allerdings notwendig, dass der LPA2-Rezeptor direkt in den präsynaptischen Terminalien exprimiert ist. Die immunocytochemischen Analysen ließen zwar vermuten, dass der LPA2-Rezeptor auch in der Präsynapse lokalisiert sein könnte, jedoch war die Auflösung der Aufnahmen nicht ausreichend, um detaillierte Aussagen zu treffen. Die zu diesem Zweck durchgeführten elektronenmikroskopischen Analysen zeigten nicht nur eine lokale Expression des Rezeptors an der aktiven Zone der Präsynapse, sondern auch, dass der LPA2-Rezeptor exklusiv in asymmetrischen (glutamatergen) Synapsen lokalisiert ist. Ein zusätzlicher Beweis für die zellartspezifische Lokalisation wurde durch die Verwendung der präsynaptischen Marker für glutamaterge (VGLUT1) und GABAerge (VGAT) Synapsen erbracht. Die Verringerung der Vesikelanzahl konnte quantitativ nur auf glutamatergen (exzitatorischen) Synapsen festgestellt werden. Allerdings war eine Reduktion von nur ungefähr 30 % zu beobachten. Das kann auf die angewandten Versuchsbedingungen zurückgeführt werden. Wie die *live imaging*-Untersuchungen bereits zeigten werden die Vesikel nach einem LPA-Stimulus unterschiedlich schnell freigesetzt. Das bedeutet, dass zum Zeitpunkt der Fixierung der Zellen nur ein Anteil der freigesetzten Vesikel erfasst werden konnte. Dass es sich dabei nicht um einen retrograden Transport der Vesikel handelt, konnte bereits in *live imaging*-Experimenten gezeigt werden. Darüber hinaus stützen die biochemischen Analysen der präparierten Vesikel dieses Ergebnis.

Die durchgeführten, elektrophysiologischen Analysen zur Freisetzung der synaptischen Vesikel nach einer LPA-Stimulation an hippocampalen Neuronen zeigten eine Verminderung der mEPSC-Frequenz (erregendes postsynaptisches Potential) und keine Veränderung der mIPSC-Frequenz (inhibitorisches postsynaptisches Potential). Im Gehirnschnitt dagegen zeigte eine Messung der spontanen Vesikelfreisetzung nach einer LPA-Stimulation eine signifikant höhere mEPSC-Frequenz jedoch keinen Unterschied in der mIPSC-Frequenz. Das deutet darauf hin, dass die Neurotransmitter auf der Präsynapse im Gehirnschnitt vermehrt freigesetzt wurden [77], in den primären Neuronen *in vitro* aber nicht (Kieselmann *et al.*, Manuskript eingereicht). In einem Gehirnschnitt sind die Neurone von Gliazellen umgeben und behalten eine dreidimensionale Struktur, wie sie auch *in vivo* vorzufinden ist. Die Diskrepanz der Ergebnisse kann sich dadurch ergeben, dass die hippocampalen Neurone aufgrund fehlender Gliazellen in ihrer Umgebung einen langsameren Metabolismus besitzen. In Betracht kommen könnte hingegen auch, dass der Vesikelzyklus in einer Kultur verlangsamt oder ein Nachschub der Vesikel aus dem Soma begrenzt ist.

Zusammenfassend legen die Ergebnisse nahe, dass LPA eine Freisetzung der synaptischen Vesikel nur in exzitatorischen Neuronen bewirkt. Weitere Daten stützen die Annahme, dass Phospholipide an der Regulation der synaptischen Funktion und Dysfunktion beteiligt sind. Für den Plättchen-aktivierenden Faktor PAF und Prostaglandin E2 konnte eine Beteiligung an Prozessen wie synaptischer Plastizität, Gedächtnisfunktion und neuronalem Schutz beschrieben werden [208-211]. Es ist denkbar, dass auch LPA in der Lage ist, solche oder ähnliche Vorgänge zu regulieren.

5.7 Fazit und Ausblick

Im Rahmen der Arbeit wurde eine gehirn- und neuronenspezifische Expression von PRG1 nachgewiesen. Die detaillierten Expressionsanalysen zeigten eine zeitabhängige Expression im Rahmen der Entwicklung des ZNS, deren Maximum zum Zeitpunkt der Spino- und Synaptogenese erreicht wurde. Subzelluläre Untersuchungen in jungen und ausdifferenzierten Neuronen ließen die Vermutung zu, dass das Membranprotein PRG1 als intrinsischer Faktor an der neuronalen Wegfindung beteiligt sein könnte. Denkbar wäre auch die Beteiligung von PRG1 an der Spino- und Synaptogenese, wobei es die Reorganisation und Stabilisation des Cytoskeletts regulieren könnte.

In qRT-PCR-Expressionsanalysen der LPA-Rezeptoren während der neuronalen Entwicklung konnten nur die mRNA-Transkripte der LPA1-, LPA2- und LPA4-Rezeptoren nachgewiesen werden. Dieser Befund zeigt, dass die Rezeptoren LPA3 und LPA5 an der Entwicklung des Gehirns gänzlich unbeteiligt bleiben und in anderen Geweben eine Rolle spielen müssen. Analysen über die Wirkung von LPA auf primäre, hippocampale Neurone *in vitro* zeigten einen transienten Calciumanstieg, der mit der Freisetzung der präsynaptischen Vesikel einherging. Dieser Effekt wird spezifisch über den LPA2-Rezeptor vermittelt und ist ausschließlich auf glutamaterge Neurone beschränkt.

Homologien im N-terminalen Bereich von PRG1 mit der LPP-Familie [212] implizieren ihre evolutionäre Verwandtschaft und deuten darauf hin, dass bioaktive Lipide wie LPA mögliche Bindungspartner oder Liganden von PRG1 sein könnten. PRG1 und LPPs besitzen Peptidsegmente, welche für die Interaktion mit solchen Molekülen notwendig sind. Insbesondere die Mutation eines hochkonservierten Histidins in der extrazellulären Domäne kann solche Interaktionen verhindern [80, 81]. Eine Deletion von PRG1 führt zu erhöhten mEPSCs in kultivierten

Neuronen und zu spontanen konvulsiven Anfällen in juvenilen KO-Mäusen [77]. So kann vermutet werden, dass PRG1 durch seine Lokalisation auf der postsynaptischen Seite, an der PSD, den Gehalt der Phospholipide in dem synaptischen Spalt, welche über die Gliazellen geliefert werden [213], durch Abbau oder die Aufnahme in die intrazelluläre Kompartimente kontrolliert. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass LPA die glutamaterge Transmission über den präsynaptisch lokalisierten LPA2-Rezeptor moduliert. PRG1 wurde ebenfalls in glutamatergen Neuronen nachgewiesen. Die Generierung der PRG1/LPA2-KO-Mäuse konnte den pathologischen Phänotyp der PRG1-KO aufheben [77]. Mittels quantitativer qRT-PCR konnte keine Veränderung der LPP-Expression (LPP1-3) in der PRG1-KO (persönliche Kommunikation, Tanja Velmans) und keine Veränderung der PRG1-Expression in der LPA2-KO (Daten nicht gezeigt) gemessen werden. Denkbar ist, dass die Modulation der neuronalen Übertragung an glutamatergen Neuronen über LPA und den präsynaptischen LPA2-Rezeptor reguliert wird, ein Mechanismus, welcher wiederum von der postsynaptischen Seite über PRG1 kontrolliert wird.

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Daten tragen dazu bei, die Entwicklung des zentralen Nervensystems und die daran beteiligten Mechanismen besser zu verstehen. Es sind jedoch noch weitere umfangreiche Untersuchungen notwendig, um diesen hochkomplexen und faszinierenden Vorgang weiter aufzuklären. Das Verständnis und das Wissen über die Entwicklung, Regeneration und Reorganisation des ZNS und des neuronalen Netzwerkes könnte dazu dienen, neue Therapiestrategien zu entwickeln, um neurodegenerative Krankheiten in Zukunft besser therapieren zu können.

6 Literaturverzeichnis

1. Moolenaar, W.H., *Lysophosphatidic acid, a multifunctional phospholipid messenger*. J Biol Chem, 1995. **270**(22): p. 12949-52.
2. Moolenaar, W.H., et al., *Lysophosphatidic acid: G-protein signalling and cellular responses*. Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(2): p. 168-73.
3. Contos, J.J., I. Ishii, and J. Chun, *Lysophosphatidic acid receptors*. Mol Pharmacol, 2000. **58**(6): p. 1188-96.
4. 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.
5. Weiner, J.A., J.H. Hecht, and J. Chun, *Lysophosphatidic acid receptor gene vzg-1/lpA1/edg-2 is expressed by mature oligodendrocytes during myelination in the postnatal murine brain*. J Comp Neurol, 1998. **398**(4): p. 587-98.
6. 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.
7. Hayashi, K., et al., *Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells induced by unsaturated lysophosphatidic acids*. Circ Res, 2001. **89**(3): p. 251-8.
8. Sano, T., et al., *Multiple mechanisms linked to platelet activation result in lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate generation in blood*. J Biol Chem, 2002. **277**(24): p. 21197-206.
9. Baker, D.L., et al., *Quantitative analysis of lysophosphatidic acid in human blood fractions*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **905**: p. 267-9.
10. Tokumura, A., et al., *Involvement of lysophospholipase D in the production of lysophosphatidic acid in rat plasma*. Biochim Biophys Acta, 1986. **875**(1): p. 31-8.
11. Sugiura, T., et al., *Lysophosphatidic acid, a growth factor-like lipid, in the saliva*. J Lipid Res, 2002. **43**(12): p. 2049-55.
12. Nakane, S., et al., *Hen egg yolk and white contain high amounts of lysophosphatidic acids, growth factor-like lipids: distinct molecular species compositions*. Lipids, 2001. **36**(4): p. 413-9.
13. Tokumura, A., *Metabolic pathways and physiological and pathological significances of lysolipid phosphate mediators*. J Cell Biochem, 2004. **92**(5): p. 869-81.
14. Tigyi, G. and R. Miledi, *Lysophosphatidates bound to serum albumin activate membrane currents in Xenopus oocytes and neurite retraction in PC12 pheochromocytoma cells*. J Biol Chem, 1992. **267**(30): p. 21360-7.
15. Eichholtz, T., et al., *The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets*. Biochem J, 1993. **291** (Pt 3): p. 677-80.
16. Thumser, A.E., J.E. Voysey, and D.C. Wilton, *The binding of lysophospholipids to rat liver fatty acid-binding protein and albumin*. Biochem J, 1994. **301** (Pt 3): p. 801-6.
17. Estivill-Torrus, G., et al., *Absence of LPA1 signaling results in defective cortical development*. Cereb Cortex, 2008. **18**(4): p. 938-50.
18. Harrison, S.M., et al., *LPA1 receptor-deficient mice have phenotypic changes observed in psychiatric disease*. Mol Cell Neurosci, 2003. **24**(4): p. 1170-9.

19. Kingsbury, M.A., et al., *Non-proliferative effects of lysophosphatidic acid enhance cortical growth and folding*. Nat Neurosci, 2003. **6**(12): p. 1292-9.
20. Sorensen, S.D., et al., *Common signaling pathways link activation of murine PAR-1, LPA, and SIP receptors to proliferation of astrocytes*. Mol Pharmacol, 2003. **64**(5): p. 1199-209.
21. 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.
22. Tigyí, G., et al., *Lysophosphatidic acid-induced neurite retraction in PC12 cells: control by phosphoinositide-Ca²⁺ signaling and Rho*. J Neurochem, 1996. **66**(2): p. 537-48.
23. Saito, S., *Effects of lysophosphatidic acid on primary cultured chick neurons*. Neurosci Lett, 1997. **229**(2): p. 73-6.
24. 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.
25. Arimura, N., et al., *Phosphorylation of collapsin response mediator protein-2 by Rho-kinase. Evidence for two separate signaling pathways for growth cone collapse*. J Biol Chem, 2000. **275**(31): p. 23973-80.
26. Yuan, X.B., et al., *Signalling and crosstalk of Rho GTPases in mediating axon guidance*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(1): p. 38-45.
27. Campbell, D.S. and C.E. Holt, *Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation*. Neuron, 2001. **32**(6): p. 1013-26.
28. Campbell, D.S. and C.E. Holt, *Apoptotic pathway and MAPKs differentially regulate chemotropic responses of retinal growth cones*. Neuron, 2003. **37**(6): p. 939-52.
29. Moller, T., D.B. Musante, and B.R. Ransom, *Lysophosphatidic acid-induced calcium signals in cultured rat oligodendrocytes*. Neuroreport, 1999. **10**(14): p. 2929-32.
30. Stankoff, B., et al., *Oligodendroglial expression of Edg-2 receptor: developmental analysis and pharmacological responses to lysophosphatidic acid*. Mol Cell Neurosci, 2002. **20**(3): p. 415-28.
31. Dawson, J., et al., *Lysophosphatidic acid induces process retraction in CG-4 line oligodendrocytes and oligodendrocyte precursor cells but not in differentiated oligodendrocytes*. J Neurochem, 2003. **87**(4): p. 947-57.
32. Moller, T., et al., *Expression and function of lysophosphatidic acid receptors in cultured rodent microglial cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(28): p. 25946-52.
33. Schilling, T., et al., *Functional importance of Ca²⁺-activated K⁺ channels for lysophosphatidic acid-induced microglial migration*. Eur J Neurosci, 2004. **19**(6): p. 1469-74.
34. Fujita, R., Y. Ma, and H. Ueda, *Lysophosphatidic acid-induced membrane ruffling and brain-derived neurotrophic factor gene expression are mediated by ATP release in primary microglia*. J Neurochem, 2008. **107**(1): p. 152-60.
35. Shiono, S., et al., *Neurotransmitter release from lysophosphatidic acid stimulated PC12 cells: involvement of lysophosphatidic acid receptors*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **193**(2): p. 667-73.
36. Inoue, M., et al., *Initiation of neuropathic pain requires lysophosphatidic acid receptor signaling*. Nat Med, 2004. **10**(7): p. 712-8.
37. 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.
38. Inoue, M., et al., *Lysophosphatidylcholine induces neuropathic pain through an action of autotaxin to generate lysophosphatidic acid*. Neuroscience, 2008. **152**(2): p. 296-8.

39. Inoue, M., et al., *Loss of spinal substance P pain transmission under the condition of LPA1 receptor-mediated neuropathic pain*. Mol Pain, 2006. **2**: p. 25.
40. Aoki, J., A. Inoue, and S. Okudaira, *Two pathways for lysophosphatidic acid production*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1781**(9): p. 513-8.
41. Watanabe, N., et al., *Both plasma lysophosphatidic acid and serum autotaxin levels are increased in chronic hepatitis C*. J Clin Gastroenterol, 2007. **41**(6): p. 616-23.
42. Nakamura, K., et al., *Suppression of lysophosphatidic acid and lysophosphatidylcholine formation in the plasma in vitro: proposal of a plasma sample preparation method for laboratory testing of these lipids*. Anal Biochem, 2007. **367**(1): p. 20-7.
43. Snitko, Y., E.T. Yoon, and W. Cho, *High specificity of human secretory class II phospholipase A2 for phosphatidic acid*. Biochem J, 1997. **321** (Pt 3): p. 737-41.
44. Fourcade, O., et al., *Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells*. Cell, 1995. **80**(6): p. 919-27.
45. Aoki, J., et al., *Structure and function of extracellular phospholipase A1 belonging to the pancreatic lipase gene family*. Biochimie, 2007. **89**(2): p. 197-204.
46. Haldar, D. and A. Vancura, *Glycerophosphate acyltransferase from liver*. Methods Enzymol, 1992. **209**: p. 64-72.
47. Bishop, W.R. and R.M. Bell, *Assembly of phospholipids into cellular membranes: biosynthesis, transmembrane movement and intracellular translocation*. Annu Rev Cell Biol, 1988. **4**: p. 579-610.
48. Jasinska, R., et al., *Lipid phosphate phosphohydrolase-1 degrades exogenous glycerolipid and sphingolipid phosphate esters*. Biochem J, 1999. **340** (Pt 3): p. 677-86.
49. Pages, C., et al., *Lysophosphatidic acid synthesis and release*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2001. **64**(1-4): p. 1-10.
50. Fukushima, N., et al., *Lysophospholipid receptors*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2001. **41**: p. 507-34.
51. An, S., et al., *Characterization of a novel subtype of human G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid*. J Biol Chem, 1998. **273**(14): p. 7906-10.
52. Bandoh, K., et al., *Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid*. J Biol Chem, 1999. **274**(39): p. 27776-85.
53. Noguchi, K., S. Ishii, and T. Shimizu, *Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family*. J Biol Chem, 2003. **278**(28): p. 25600-6.
54. Lee, C.W., et al., *GPR92 as a new G12/13- and Gq-coupled lysophosphatidic acid receptor that increases cAMP, LPA5*. J Biol Chem, 2006. **281**(33): p. 23589-97.
55. Kotarsky, K., et al., *Lysophosphatidic acid binds to and activates GPR92, a G protein-coupled receptor highly expressed in gastrointestinal lymphocytes*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. **318**(2): p. 619-28.
56. 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.
57. 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.
58. 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.

59. Bandoh, K., et al., *Lysophosphatidic acid (LPA) receptors of the EDG family are differentially activated by LPA species. Structure-activity relationship of cloned LPA receptors.* FEBS Lett, 2000. **478**(1-2): p. 159-65.
60. Fujiwara, Y., et al., *Identification of residues responsible for ligand recognition and regioisomeric selectivity of lysophosphatidic acid receptors expressed in mammalian cells.* J Biol Chem, 2005. **280**(41): p. 35038-50.
61. 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.
62. 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.
63. Weiner, J.A. and J. Chun, *Schwann cell survival mediated by the signaling phospholipid lysophosphatidic acid.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(9): p. 5233-8.
64. Matas-Rico, E., et al., *Deletion of lysophosphatidic acid receptor LPA1 reduces neurogenesis in the mouse dentate gyrus.* Mol Cell Neurosci, 2008. **39**(3): p. 342-55.
65. Tager, A.M., et al., *The lysophosphatidic acid receptor LPA1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak.* Nat Med, 2008. **14**(1): p. 45-54.
66. Pradere, J.P., et al., *Lysophosphatidic acid and renal fibrosis.* Biochim Biophys Acta, 2008. **1781**(9): p. 582-7.
67. Ishii, I., et al., *Lysophospholipid receptors: signaling and biology.* Annu Rev Biochem, 2004. **73**: p. 321-54.
68. Panchatcharam, M., et al., *Lysophosphatidic acid receptors 1 and 2 play roles in regulation of vascular injury responses but not blood pressure.* Circ Res, 2008. **103**(6): p. 662-70.
69. Contos, J.J., et al., *Characterization of lpa(2) (Edg4) and lpa(1)/lpa(2) (Edg2/Edg4) lysophosphatidic acid receptor knockout mice: signaling deficits without obvious phenotypic abnormality attributable to lpa(2).* Mol Cell Biol, 2002. **22**(19): p. 6921-9.
70. Spohr, T.C., et al., *Lysophosphatidic acid receptor-dependent secondary effects via astrocytes promote neuronal differentiation.* J Biol Chem, 2008. **283**(12): p. 7470-9.
71. Ye, X. and J. Chun, *Lysophosphatidic acid (LPA) signaling in vertebrate reproduction.* Trends Endocrinol Metab, 2009.
72. Ye, X., et al., *LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing.* Nature, 2005. **435**(7038): p. 104-8.
73. Yanagida, K., et al., *LPA4/p2y9/GPR23 mediates rho-dependent morphological changes in a rat neuronal cell line.* J Biol Chem, 2007. **282**(8): p. 5814-24.
74. Lee, Z., et al., *Role of LPA4/p2y9/GPR23 in negative regulation of cell motility.* Mol Biol Cell, 2008. **19**(12): p. 5435-45.
75. 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.
76. 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.
77. Trimbuch, T., et al., *Synaptic PRG-1 modulates excitatory transmission via lipid phosphate-mediated signaling.* Cell, 2009. **138**(6): p. 1222-35.
78. Zhang, N., et al., *The Drosophila protein Wunen repels migrating germ cells.* Nature, 1997. **385**(6611): p. 64-7.

79. Brindley, D.N. and D.W. Waggoner, *Mammalian lipid phosphate phosphohydrolases*. J Biol Chem, 1998. **273**(38): p. 24281-4.
80. 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.
81. Starz-Gaiano, M., et al., *Spatially restricted activity of a Drosophila lipid phosphatase guides migrating germ cells*. Development, 2001. **128**(6): p. 983-91.
82. Sudhof, T.C., *The synaptic vesicle cycle*. Annu Rev Neurosci, 2004. **27**: p. 509-47.
83. Rohrbough, J. and K. Broadie, *Lipid regulation of the synaptic vesicle cycle*. Nat Rev Neurosci, 2005. **6**(2): p. 139-50.
84. Chapman, E.R., *Synaptotagmin: a Ca²⁺ sensor that triggers exocytosis?* Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(7): p. 498-508.
85. Neher, E., *Vesicle pools and Ca²⁺ microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release*. Neuron, 1998. **20**(3): p. 389-99.
86. Schneggenburger, R. and E. Neher, *Presynaptic calcium and control of vesicle fusion*. Curr Opin Neurobiol, 2005. **15**(3): p. 266-74.
87. Fernandez-Chacon, R., et al., *Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 41-9.
88. Koh, T.W. and H.J. Bellen, *Synaptotagmin I, a Ca²⁺ sensor for neurotransmitter release*. Trends Neurosci, 2003. **26**(8): p. 413-22.
89. Martens, S., M.M. Kozlov, and H.T. McMahon, *How synaptotagmin promotes membrane fusion*. Science, 2007. **316**(5828): p. 1205-8.
90. Evans, R.M. and G.W. Zamponi, *Presynaptic Ca²⁺ channels--integration centers for neuronal signaling pathways*. Trends Neurosci, 2006. **29**(11): p. 617-24.
91. Reid, C.A., J.M. Bekkers, and J.D. Clements, *Presynaptic Ca²⁺ channels: a functional patchwork*. Trends Neurosci, 2003. **26**(12): p. 683-7.
92. Ishikawa, T., et al., *Presynaptic N-type and P/Q-type Ca²⁺ channels mediating synaptic transmission at the calyx of Held of mice*. J Physiol, 2005. **568**(Pt 1): p. 199-209.
93. Heinemann, C., et al., *A two-step model of secretion control in neuroendocrine cells*. Pflugers Arch, 1993. **424**(2): p. 105-12.
94. Ashery, U., et al., *Munc13-1 acts as a priming factor for large dense-core vesicles in bovine chromaffin cells*. EMBO J, 2000. **19**(14): p. 3586-96.
95. Heinemann, C., et al., *Kinetics of the secretory response in bovine chromaffin cells following flash photolysis of caged Ca²⁺*. Biophys J, 1994. **67**(6): p. 2546-57.
96. Voets, T., E. Neher, and T. Moser, *Mechanisms underlying phasic and sustained secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices*. Neuron, 1999. **23**(3): p. 607-15.
97. Cremona, O., et al., *Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling*. Cell, 1999. **99**(2): p. 179-88.
98. Martin, T.F., *PI(4,5)P₂ regulation of surface membrane traffic*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(4): p. 493-9.
99. Di Paolo, G., et al., *Impaired PtdIns(4,5)P₂ synthesis in nerve terminals produces defects in synaptic vesicle trafficking*. Nature, 2004. **431**(7007): p. 415-22.
100. Wenk, M.R. and P. De Camilli, *Protein-lipid interactions and phosphoinositide metabolism in membrane traffic: insights from vesicle recycling in nerve terminals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(22): p. 8262-9.
101. Martin, T.F., *Racing lipid rafts for synaptic-vesicle formation*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(1): p. E9-11.
102. Wu, L., et al., *Dual regulation of voltage-gated calcium channels by PtdIns(4,5)P₂*. Nature, 2002. **419**(6910): p. 947-52.

103. Salaun, C., D.J. James, and L.H. Chamberlain, *Lipid rafts and the regulation of exocytosis*. Traffic, 2004. **5**(4): p. 255-64.
104. Staneva, G., M.I. Angelova, and K. Koumanov, *Phospholipase A2 promotes raft budding and fission from giant liposomes*. Chem Phys Lipids, 2004. **129**(1): p. 53-62.
105. Brown, W.J., K. Chambers, and A. Doody, *Phospholipase A2 (PLA2) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function*. Traffic, 2003. **4**(4): p. 214-21.
106. Cremona, O. and P. De Camilli, *Phosphoinositides in membrane traffic at the synapse*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 6): p. 1041-52.
107. 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.
108. Bain, G., et al., *Retinoic acid promotes neural and represses mesodermal gene expression in mouse embryonic stem cells in culture*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **223**(3): p. 691-4.
109. Ying, Q.L. and A.G. Smith, *Defined conditions for neural commitment and differentiation*. Methods Enzymol, 2003. **365**: p. 327-41.
110. 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.
111. Fraichard, A., et al., *In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons*. J Cell Sci, 1995. **108 (Pt 10)**: p. 3181-8.
112. Okabe, S., et al., *Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro*. Mech Dev, 1996. **59**(1): p. 89-102.
113. Strubing, C., et al., *Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons*. Mech Dev, 1995. **53**(2): p. 275-87.
114. Boheler, K.R., et al., *Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes*. Circ Res, 2002. **91**(3): p. 189-201.
115. Maltsev, V.A., et al., *Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents*. Circ Res, 1994. **75**(2): p. 233-44.
116. Miller-Hance, W.C., et al., *In vitro chamber specification during embryonic stem cell cardiogenesis. Expression of the ventricular myosin light chain-2 gene is independent of heart tube formation*. J Biol Chem, 1993. **268**(33): p. 25244-52.
117. Craig, A.M. and G. Banker, *Neuronal polarity*. Annu Rev Neurosci, 1994. **17**: p. 267-310.
118. Arimura, N. and K. Kaibuchi, *Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(3): p. 194-205.
119. 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.
120. Wiggin, G.R., J.P. Fawcett, and T. Pawson, *Polarity proteins in axon specification and synaptogenesis*. Dev Cell, 2005. **8**(6): p. 803-16.
121. Lynch, K.R., *Lysophospholipid receptor nomenclature*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1582**(1-3): p. 70-1.
122. Shimomura, Y., et al., *Disruption of P2RY5, an orphan G protein-coupled receptor, underlies autosomal recessive woolly hair*. Nat Genet, 2008. **40**(3): p. 335-9.
123. Noguchi, K., et al., *Lysophosphatidic acid (LPA) and its receptors*. Curr Opin Pharmacol, 2009. **9**(1): p. 15-23.

124. Fukushima, N., *LPA in neural cell development*. J Cell Biochem, 2004. **92**(5): p. 993-1003.
125. Toman, R.E. and S. Spiegel, *Lysophospholipid receptors in the nervous system*. Neurochem Res, 2002. **27**(7-8): p. 619-27.
126. Holtsberg, F.W., et al., *Lysophosphatidic acid induces a sustained elevation of neuronal intracellular calcium*. J Neurochem, 1997. **69**(1): p. 68-75.
127. Manning, T.J., Jr. and H. Sontheimer, *Bovine serum albumin and lysophosphatidic acid stimulate calcium mobilization and reversal of cAMP-induced stellation in rat spinal cord astrocytes*. Glia, 1997. **20**(2): p. 163-72.
128. Xu, Y.J., et al., *Mechanisms of the lysophosphatidic acid-induced increase in [Ca(2+)](i) in skeletal muscle cells*. J Cell Mol Med, 2008. **12**(3): p. 942-54.
129. Hollmann, M., et al., *Molecular biology of glutamate receptors. Potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor splice variants by zinc*. Ren Physiol Biochem, 1994. **17**(3-4): p. 182-3.
130. Maren, S. and M. Baudry, *Properties and mechanisms of long-term synaptic plasticity in the mammalian brain: relationships to learning and memory*. Neurobiol Learn Mem, 1995. **63**(1): p. 1-18.
131. Anliker, B. and J. Chun, *Cell surface receptors in lysophospholipid signaling*. Semin Cell Dev Biol, 2004. **15**(5): p. 457-65.
132. 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.
133. Sayas, C.L., et al., *The neurite retraction induced by lysophosphatidic acid increases Alzheimer's disease-like Tau phosphorylation*. J Biol Chem, 1999. **274**(52): p. 37046-52.
134. Xiao, R.P., X. Ji, and E.G. Lakatta, *Functional coupling of the beta 2-adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes*. Mol Pharmacol, 1995. **47**(2): p. 322-9.
135. Mantelli, L., et al., *Pertussis toxin does not affect the adenosine-induced inhibition of the efferent function of cardiac capsaicin-sensitive nerves*. J Neural Transm Gen Sect, 1993. **92**(1): p. 51-6.
136. Takenouchi, T., et al., *Inhibitory effects of U73122 and U73343 on Ca²⁺ influx and pore formation induced by the activation of P2X7 nucleotide receptors in mouse microglial cell line*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1726**(2): p. 177-86.
137. Oka, T., et al., *Xestospongine C, a novel blocker of IP₃ receptor, attenuates the increase in cytosolic calcium level and degranulation that is induced by antigen in RBL-2H3 mast cells*. Br J Pharmacol, 2002. **135**(8): p. 1959-66.
138. Lytton, J., M. Westlin, and M.R. Hanley, *Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps*. J Biol Chem, 1991. **266**(26): p. 17067-71.
139. Kijima, Y., E. Ogunbunmi, and S. Fleischer, *Drug action of thapsigargin on the Ca²⁺ pump protein of sarcoplasmic reticulum*. J Biol Chem, 1991. **266**(34): p. 22912-8.
140. Gericke, M., G. Droogmans, and B. Nilius, *Thapsigargin discharges intracellular calcium stores and induces transmembrane currents in human endothelial cells*. Pflugers Arch, 1993. **422**(6): p. 552-7.
141. Dolor, R.J., et al., *Regulation of extracellular calcium entry in endothelial cells: role of intracellular calcium pool*. Am J Physiol, 1992. **262**(1 Pt 1): p. C171-81.
142. Teramoto, T., et al., *A novel type of calcium channel sensitive to omega-agatoxin-TK in cultured rat cerebral cortical neurons*. Brain Res, 1997. **756**(1-2): p. 225-30.

143. Teramoto, T., et al., *Two types of calcium channels sensitive to omega-agatoxin- TK in cultured rat hippocampal neurones*. Neuroreport, 1995. **6**(12): p. 1684-8.
144. Sitges, M. and C.A. Galindo, *Omega-agatoxin-TK is a useful tool to study P-type Ca²⁺ channel-mediated changes in internal Ca²⁺ and glutamate release in depolarised brain nerve terminals*. Neurochem Int, 2005. **46**(1): p. 53-60.
145. Uchitel, O.D., *Toxins affecting calcium channels in neurons*. Toxicol, 1997. **35**(8): p. 1161-91.
146. Motin, L. and D.J. Adams, *omega-Conotoxin inhibition of excitatory synaptic transmission evoked by dorsal root stimulation in rat superficial dorsal horn*. Neuropharmacology, 2008. **55**(5): p. 860-4.
147. Kahraman, S., et al., *GABAergic mechanism of propofol toxicity in immature neurons*. J Neurosurg Anesthesiol, 2008. **20**(4): p. 233-40.
148. Stork, A.P. and T.M. Cocks, *Pharmacological reactivity of human epicardial coronary arteries: characterization of relaxation responses to endothelium-derived relaxing factor*. Br J Pharmacol, 1994. **113**(4): p. 1099-104.
149. Gasparini, S., et al., *Presynaptic R-type calcium channels contribute to fast excitatory synaptic transmission in the rat hippocampus*. J Neurosci, 2001. **21**(22): p. 8715-21.
150. Newcomb, R., et al., *Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas**. Biochemistry, 1998. **37**(44): p. 15353-62.
151. Burrone, J., Z. Li, and V.N. Murthy, *Studying vesicle cycling in presynaptic terminals using the genetically encoded probe synaptotHluorin*. Nat Protoc, 2006. **1**(6): p. 2970-8.
152. Greenbaum, D., R. Jansen, and M. Gerstein, *Analysis of mRNA expression and protein abundance data: an approach for the comparison of the enrichment of features in the cellular population of proteins and transcripts*. Bioinformatics, 2002. **18**(4): p. 585-96.
153. Nie, L., G. Wu, and W. Zhang, *Correlation of mRNA expression and protein abundance affected by multiple sequence features related to translational efficiency in *Desulfovibrio vulgaris*: a quantitative analysis*. Genetics, 2006. **174**(4): p. 2229-43.
154. Nie, L., G. Wu, and W. Zhang, *Correlation between mRNA and protein abundance in *Desulfovibrio vulgaris*: a multiple regression to identify sources of variations*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **339**(2): p. 603-10.
155. Ming, G.L. and H. Song, *Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system*. Annu Rev Neurosci, 2005. **28**: p. 223-50.
156. Altman, J., *Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. II. Phases in the maturation of Purkinje cells and of the molecular layer*. J Comp Neurol, 1972. **145**(4): p. 399-463.
157. Shimono, T., S. Nosaka, and K. Sasaki, *Electrophysiological study on the postnatal development of neuronal mechanisms in the rat cerebellar cortex*. Brain Res, 1976. **108**(2): p. 279-94.
158. Mariani, J. and J.P. Changeux, *Ontogenesis of olivocerebellar relationships. II. Spontaneous activity of inferior olivary neurons and climbing fiber-mediated activity of cerebellar Purkinje cells in developing rats*. J Neurosci, 1981. **1**(7): p. 703-9.
159. Ishikawa, R. and K. Kohama, *Actin-binding proteins in nerve cell growth cones*. J Pharmacol Sci, 2007. **105**(1): p. 6-11.
160. Gordon-Weeks, P.R., *Microtubule organization in growth cones*. Biochem Soc Trans, 1991. **19**(4): p. 1080-5.
161. Mueller, B.K., *Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding*. Annu Rev Neurosci, 1999. **22**: p. 351-88.

162. 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.
163. Menager, C., et al., *PIP3 is involved in neuronal polarization and axon formation*. J Neurochem, 2004. **89**(1): p. 109-18.
164. Yoshimura, T., et al., *Ras regulates neuronal polarity via the PI3-kinase/Akt/GSK-3beta/CRMP-2 pathway*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **340**(1): p. 62-8.
165. da Silva, J.S. and C.G. Dotti, *Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis*. Nat Rev Neurosci, 2002. **3**(9): p. 694-704.
166. Jan, Y.N. and L.Y. Jan, *The control of dendrite development*. Neuron, 2003. **40**(2): p. 229-42.
167. Parrish, J.Z., et al., *Mechanisms that regulate establishment, maintenance, and remodeling of dendritic fields*. Annu Rev Neurosci, 2007. **30**: p. 399-423.
168. 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.
169. Yoshimura, T., et al., *GSK-3beta regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity*. Cell, 2005. **120**(1): p. 137-49.
170. Dontchev, V.D. and P.C. Letourneau, *Nerve growth factor and semaphorin 3A signaling pathways interact in regulating sensory neuronal growth cone motility*. J Neurosci, 2002. **22**(15): p. 6659-69.
171. Shewan, D., et al., *Age-related changes underlie switch in netrin-1 responsiveness as growth cones advance along visual pathway*. Nat Neurosci, 2002. **5**(10): p. 955-62.
172. Kossel, A.H., et al., *Afferent innervation influences the development of dendritic branches and spines via both activity-dependent and non-activity-dependent mechanisms*. J Neurosci, 1997. **17**(16): p. 6314-24.
173. McCormick, F., *Ras-related proteins in signal transduction and growth control*. Mol Reprod Dev, 1995. **42**(4): p. 500-6.
174. Ahnert-Hilger, G., et al., *Differential effects of Rho GTPases on axonal and dendritic development in hippocampal neurones*. J Neurochem, 2004. **90**(1): p. 9-18.
175. Hayashi, K., T. Ohshima, and K. Mikoshiba, *Pak1 is involved in dendrite initiation as a downstream effector of Rac1 in cortical neurons*. Mol Cell Neurosci, 2002. **20**(4): p. 579-94.
176. Kennedy, M.B., *Signal-processing machines at the postsynaptic density*. Science, 2000. **290**(5492): p. 750-4.
177. Husi, H., et al., *Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes*. Nat Neurosci, 2000. **3**(7): p. 661-9.
178. Wouterlood, F.G., T. Bockers, and M.P. Witter, *Synaptic contacts between identified neurons visualized in the confocal laser scanning microscope. Neuroanatomical tracing combined with immunofluorescence detection of post-synaptic density proteins and target neuron-markers*. J Neurosci Methods, 2003. **128**(1-2): p. 129-42.
179. Brakeman, P.R., et al., *Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors*. Nature, 1997. **386**(6622): p. 284-8.
180. Ohuchi, H., et al., *Expression patterns of the lysophospholipid receptor genes during mouse early development*. Dev Dyn, 2008. **237**(11): p. 3280-94.
181. Handford, E.J., et al., *Edg2 receptor distribution in adult rat brain*. Neuroreport, 2001. **12**(4): p. 757-60.
182. Allard, J., et al., *A rat G protein-coupled receptor selectively expressed in myelin-forming cells*. Eur J Neurosci, 1998. **10**(3): p. 1045-53.

183. Choi, J.W., et al., *LPA receptors: subtypes and biological actions*. Annu Rev Pharmacol Toxicol. **50**: p. 157-86.
184. Ye, X., et al., *Lysophosphatidic acid in neural signaling*. Neuroreport, 2002. **13**(17): p. 2169-75.
185. Zhou, F.Q. and W.D. Snider, *Cell biology. GSK-3beta and microtubule assembly in axons*. Science, 2005. **308**(5719): p. 211-4.
186. Sayas, C.L., et al., *GSK-3 is activated by the tyrosine kinase Pyk2 during LPA1-mediated neurite retraction*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(4): p. 1834-44.
187. Lloyd, B., et al., *Lysophosphatidic acid signaling controls cortical actin assembly and cytoarchitecture in Xenopus embryos*. Development, 2005. **132**(4): p. 805-16.
188. Tao, Q., et al., *A novel G protein-coupled receptor, related to GPR4, is required for assembly of the cortical actin skeleton in early Xenopus embryos*. Development, 2005. **132**(12): p. 2825-36.
189. Tabuchi, S., et al., *Expression of lysophosphatidic acid receptor in rat astrocytes: mitogenic effect and expression of neurotrophic genes*. Neurochem Res, 2000. **25**(5): p. 573-82.
190. Tigyi, G., D.L. Dyer, and R. Miledi, *Lysophosphatidic acid possesses dual action in cell proliferation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(5): p. 1908-12.
191. Sugiura, T., et al., *Occurrence of lysophosphatidic acid and its alkyl ether-linked analog in rat brain and comparison of their biological activities toward cultured neural cells*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1440**(2-3): p. 194-204.
192. Steiner, M.R., et al., *Lysophosphatidic acid induction of neuronal apoptosis and necrosis*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **905**: p. 132-41.
193. Fukushima, N. and J. Chun, *The LPA receptors*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2001. **64**(1-4): p. 21-32.
194. de Jong, A.P. and M. Verhage, *Presynaptic signal transduction pathways that modulate synaptic transmission*. Curr Opin Neurobiol, 2009. **19**(3): p. 245-53.
195. Richards, M.W., A.J. Butcher, and A.C. Dolphin, *Ca²⁺ channel beta-subunits: structural insights AID our understanding*. Trends Pharmacol Sci, 2004. **25**(12): p. 626-32.
196. Kamp, M.A., et al., *Presynaptic 'Ca_v2.3-containing' E-type Ca channels share dual roles during neurotransmitter release*. Eur J Neurosci, 2005. **21**(6): p. 1617-25.
197. Altier, C. and G.W. Zamponi, *Signaling complexes of voltage-gated calcium channels and G protein-coupled receptors*. J Recept Signal Transduct Res, 2008. **28**(1-2): p. 71-81.
198. Dunlap, K. and G.D. Fischbach, *Neurotransmitters decrease the calcium component of sensory neurone action potentials*. Nature, 1978. **276**(5690): p. 837-9.
199. Dunlap, K. and G.D. Fischbach, *Neurotransmitters decrease the calcium conductance activated by depolarization of embryonic chick sensory neurones*. J Physiol, 1981. **317**: p. 519-35.
200. Miesenbock, G., D.A. De Angelis, and J.E. Rothman, *Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins*. Nature, 1998. **394**(6689): p. 192-5.
201. Sankaranarayanan, S., et al., *The use of pHluorins for optical measurements of presynaptic activity*. Biophys J, 2000. **79**(4): p. 2199-208.
202. Sankaranarayanan, S. and T.A. Ryan, *Real-time measurements of vesicle-SNARE recycling in synapses of the central nervous system*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(4): p. 197-204.
203. Atluri, P.P. and T.A. Ryan, *The kinetics of synaptic vesicle reacidification at hippocampal nerve terminals*. J Neurosci, 2006. **26**(8): p. 2313-20.

204. Wierda, K.D., et al., *Interdependence of PKC-dependent and PKC-independent pathways for presynaptic plasticity*. Neuron, 2007. **54**(2): p. 275-90.
205. Rhee, J.S., et al., *Beta phorbol ester- and diacylglycerol-induced augmentation of transmitter release is mediated by Munc13s and not by PKCs*. Cell, 2002. **108**(1): p. 121-33.
206. Basu, J., et al., *Munc13-1 C1 domain activation lowers the energy barrier for synaptic vesicle fusion*. J Neurosci, 2007. **27**(5): p. 1200-10.
207. Lou, X., et al., *Phorbol esters modulate spontaneous and Ca²⁺-evoked transmitter release via acting on both Munc13 and protein kinase C*. J Neurosci, 2008. **28**(33): p. 8257-67.
208. Clark, G.D., et al., *Enhancement of hippocampal excitatory synaptic transmission by platelet-activating factor*. Neuron, 1992. **9**(6): p. 1211-6.
209. Kato, K., et al., *Platelet-activating factor as a potential retrograde messenger in CA1 hippocampal long-term potentiation*. Nature, 1994. **367**(6459): p. 175-9.
210. Izquierdo, I. and J.H. Medina, *Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory*. Neurobiol Learn Mem, 1995. **63**(1): p. 19-32.
211. Chen, C. and N.G. Bazan, *Platelet-activating factor inhibits ionotropic GABA receptor activity in cultured hippocampal neurons*. Neuroreport, 1999. **10**(18): p. 3831-5.
212. 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.
213. 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.
214. Peeva, G.P., et al., *Improved outcome of facial nerve repair in rats is associated with enhanced regenerative response of motoneurons and augmented neocortical plasticity*. Eur J Neurosci, 2006. **24**(8): p. 2152-62.
215. Nurnberg, A., et al., *Antagonistic regulation of neurite morphology through Gq/G11 and G12/G13*. J Biol Chem, 2008. **283**(51): p. 35526-31.

7 Anhang

7.1 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsverzeichnis

Publikationen

Trimbuch T, Beed P, Vogt J, Schuchmann S, Maier N, Kintscher M, Breustedt J, Schuelke M, Streu N, **Kieselmann O**, Brunk I, Laube G, Strauss U, Battenfeld A, Wende H, Birchmeier C, Wiese S, Sendtner M, Kawabe H, Kishimoto-Suga M, Brose N, Baumgart J, Geist B, Aoki J, Savaskan NE, Bräuer AU, Chun J, Ninnemann O, Schmitz D, Nitsch R.: *Synaptic PRG-1 modulates excitatory transmission via lipid phosphate-mediated signaling.*

Cell. 2009 Sep 18;138(6):1222-35.

Kieselmann O*, Battenfeld A*, Stadler K, Singh B, Henneberger C, Aoki J, Chun J, Grantyn R, Nitsch R, Strauss U, Bräuer A.: *Central glutamatergic transmission is controlled by lysophosphatidic acid*
Manuskript eingereicht bei PNAS

Kieselmann O, Aoki J, Chun J, Bräuer A.: *Lysophosphatidic acid receptor distribution during neuronal development in mouse*

Manuskript in Vorbereitung

* gleichberechtigt

Präsentationen

Kieselmann O, Aoki J, Chun J, Grantyn R, Strauss U, Nitsch R, Bräuer AU.

The 8th Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen, Deutschland (2009)

Posterpräsentation: *Central glutamatergic transmission is controlled by lysophosphatidic acid*

Kieselmann O, Grantyn R, Nitsch R, Bräuer AU.

Berlin Brain Days 5th International Ph.D. Symposium, Berlin, Deutschland (2008)

Vortrag: *Lysophosphatidic acid effects on cultured primary neurons*

Kieselmann O, Grantyn R, Singh B, Aoki J, Nitsch R, Bräuer AU.

Berlin Neuroscience Forum, Liebenwalde, Deutschland (2008)

Posterpräsentation: *Lysophosphatidic acid in synaptogenesis*

Kieselmann O, Aoki J, Nitsch R, Bräuer AU.

SFB665, International Symposium: Developmental Disturbances in the Nervous System, Potsdam, Deutschland (2007)

Posterpräsentation: *Lysophospholipid signaling in neuronal development*

Kieselmann O, Singh B, Grantyn R, Nitsch R, Bräuer AU.

18th European Students' Conference, Berlin, Deutschland (2007)

Vortrag: *Is plasticity related gene-1 involved in synaptogenesis?*

Kieselmann O, Aoki J, Nitsch R, Bräuer AU.

FASEB Summer Research Conference: Lysophospholipid Mediators in Health and Disease, Tucson, USA (2007)

Posterpräsentation: *Lysophospholipid signaling in neuronal development*

Kieselmann O, Chun J, Aoki J, Savaskan NE, Nitsch R, Bräuer AU.

17th European Students' Conference, Berlin, Deutschland (2006)

Posterpräsentation: *Functional consequences after translocation in microdomains of PRG-1 on the LPA-2 receptor including signalling cascade*

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Juniorprofessorin Dr. Anja U. Bräuer bedanken für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit im Institut für Zell- und Neurobiologie, für die Betreuung und ihre Unterstützung die über die Durchführung dieser Arbeit hinausging.

Bei Herrn Professor Dr. Rupert Mutzel möchte ich mich herzlich für die Übernahme des Erstgutachtens bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Stefan Schumacher. Sein Fachwissen und seine Korrekturen haben zum erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit beigetragen sowie ein stets offenes Ohr und seine Ratschläge in manch Krisensituation mir sehr geholfen.

Insbesondere möchte ich mich bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der AG Bräuer, für ihre Hilfestellung, praktische Tipps und aufmunternde Worte bedanken. Ganz besonders gilt mein Dank: Tanja Velmans, Bettina Brokowski, Jan Csupor, Rike Dannenberg, Nora Ebermann, Linda Rocha, Justus Goyn, Anna Soriguera, Luca Coiro sowie Anne Bennert. Großer Dank gebührt Linda, Tanja und Bettina für die schöne Zeit außerhalb des Labors.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen anderen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Zell- und Neurobiologie bedanken für alle Hilfestellungen und die schöne Zeit während der Durchführung dieser Arbeit. Insbesondere sind dies (in alphabetischer Reihenfolge): Prof. Dr. Gudrun Ahnert-Hilger, Arne Battefled, Dr. Christine Brandt, Dr. Rudolf Deisz, Monika Dulinski, Kristin Franke, Beate Geist, André Gronau, Peter Köhler, Denis Lajkó, Sabine Lewandowski, Ari Liebkowsky, Dr. Olaf Ninnemann, Miriam Petzold, Marni Pollrich, Dr. Karl Roth, Jutta Schüler, Alina Smorodchenko, Konstantin Stadler, Angelika Steuer, Dr. Ulf Strauß, Gudrun Thomaschek, Dr. Thorsten Trimbuch und Dr. Volker Meske.

Für die Korrektur dieser Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bei Annika, Tanja, André und Thomas bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meinen Freunden, die mich in allen Höhen und Tiefen unterstützt und immer zu mir gehalten haben, insbesondere möchte ich mich bei Annika, Valli, Marleen und Martin bedanken.

Mein größter Dank gebührt an dieser Stelle jedoch meiner Familie und Thomas. Ihr habt mir geholfen dort anzukommen wo ich heute bin. Ohne Euch hätte ich es nicht geschafft.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Olga Kieselmann, geboren am 31.10.1981, an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und ohne unzulässige Hilfe angefertigt habe.

Berlin, den _____ 2010

Olga Kieselmann