Aus dem Centrum für Anatomie Institut für Zell- und Neurobiologie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Das Expressionsmuster von Plasticity Related Gene 3 und Plasticity Related Gene 4 im sich entwickelnden Gehirn der Ratte

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anne Bennert

aus Berlin

Seite 2

Gutachter/in:

1. Prof. Dr. A. Bräuer

2. Prof. Dr. med. I. Bechmann

3. Prof. Dr. med. T. Deufel

Datum der Promotion: 07.09.2012

Inhaltsverzeichnis

Inhal	tsverzeichr	nis		Ι
Abkü	rzungsverz	zeichnis		VI
1	Einleitun	g		1
	1.1 Z e	llulärer Au	fbau des Zentralnervensystems	2
	1.1.1	Neurone		2
	1.1	.1.1 Dendri	ten	2
	1.1	1.1.2 Axone		3
	1.1	1.3 Synaps	en	3
	1.1	1.1.4 Morph	ologische und funktionelle Untergliederung von	
		Neuron	pen	3
	1.1.2	Gliazellen		4
	1.1	.2.1 Astrozy	pten	4
	1.1	.2.2 Oligod	endrozyten	5
	1.1	.2.3 Mikrog	lia	5
	1.1.3	Ependym		5
	1.2 Au	ıfbau des K	ortex, Hippocampus und Cerebellums	6
	1.2.1	Kortex		6
	1.2.2	Hippocam	pus	7
	1.2.3	Cerebellun	n	8
	1.3 E r	ntwicklung	des Kortex, Hippocampus und Cerebellums	10
	1.3.1	Neurogene	se im Kortex	10
	1.3.2	Neurogene	se im Hippocampu s	12
	1.3.3	Neurogene	se im Cerebellum	12
	1.3.4	Gliogenese	2	13
	1.3.5	Regulieren	de Faktoren der Entwicklung des ZNS	14
	1.4 Li	pid Phosph	atasen/Phosphotransferasen	15
	1.4.1	Lipid Phos	phat Phosphatasen und ihre Substrate	16
	1.4	4.1.1 Struktu	r, Lokalisation und Expression der LPPs	16
	1.4	4.1.2 Bioakti	ve Phospholipide und ihre Funktionen	18
		1.4.1.2.1	LPA-Rezeptoren	19
		1.4.1.2.2	Metabolismus von Phospholipiden	19
	1.4	4.1.3 Regula	tion des Verhältnisses bioaktiver	

		Phospholipide und ihrer dephosphorylierten Metabolite	
		durch Lipid Phosphat Phosphatasen	20
	1.5 Pl	asticity Related Genes	20
2	Herleitur	ng der Aufgabenstellung	24
3	Material	und Methoden	25
	3.1 M	aterialien	25
	3.1.1	Reagenzien	25
	3.1.2	Kits	25
	3.1.3	Geräte	26
	3.1.4	Software	26
	3.1.5	primäre Antikörper	26
	3.1.6	sekundäre Antikörper	27
	3.1.7	Versuchstiere	28
	3.1.8	Peptide	28
	3.1.9	Zelllinien und Mikroorganismen	28
	3.1.10) Vektoren und Überexpressionsplasmide	29
	3.1.11	Puffer und Lösungen	29
	3.2 M	ethoden	31
	3.2.1	Zellkultur	31
	3.2	2.1.1 Kultur, Passage und Konservierung von Zelllinien	31
	3.2	2.1.2 Transfektion von COS-7-Zellen	32
		3.2.1.2.1 Plasmid-DNA-Isolierung	32
		3.2.1.2.2 Transfektion	32
	3.2.2	Generierung von polyklonalen PRG-3- und PRG-4-	
		Peptidantikörpern	33
	3.2.3	Proteinbiochemische Methoden	34
	3.2	2.3.1 Isolierung von Totalproteinlysaten aus Geweben	
		von Wistarratten	34
	3.2	2.3.2 Isolierung von zytosolischen, Membran- und	
		Kernproteinen aus HEK293-Zellen	34
	3.2	2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	34
	3.2	2.3.4 Präparation von rekombinanten Proteinen aus	
		COS-7-Zellen mit dem µMacs Kit	35

	3.2	2.3.5 Präpa	ration von rekombinanten Proteinen mit Hilfe der	
		Immun	präzipitation nach [151]	35
	3.2	2.3.6 SDS-P	AGE und Immunblot	36
		3.2.3.6.1	SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)	36
		3.2.3.6.2	Immunblot	36
	3.2	.3.7 Detekt	ion der Proteine mit dem PRG-3- bzw.	
		PRG-4	l-Antikörper	37
	3.2	2.3.8 Prüfun	ng der Spezifität des PRG-3- bzw. PRG-4-Antikörpers	37
3.	.2.4	Immunhist	tochemie	38
	3.2	2.4.1 Anästh	nesie von Wistarratten	38
	3.2	2.4.2 Perfus	ion von Wistarratten	38
	3.2	2.4.3 Gehirr	<i>ipräparation</i>	39
	3.2	2.4.4 Vibrat	omschnitte	39
	3.2	2.4.5 Immun	histochemische Färbungen	40
		3.2.4.5.1	DAB-Färbung	40
		3.2.4.5.2	Identifizierung von PRG-3 und	
			PRG-4 mittels Doppelimmunfluoreszenz	42
		3.2.4.5.3	Doppelimmunfluoreszenz auf embryonalem	
			Gehirngewebe	44
3.	.2.5	Elektroner	nmikroskopie	45
3.	.2.6	Mikroskop	pische Auswertung	46
Erge	bnis	se		47
4.1	Ge	enerierung	von polyklonalen PRG-3- und	
	PF	RG-4-Pepti	dantikörpern	47
4.2	Ve	rifizierung	g der Spezifität der Antikörper	54
4.	.2.1	Spezifität	des PRG-3-Antikörpers	54
4.	.2.2	Spezifität	des PRG-4-Antikörpers	56
4.3	Ve	ergleich zw	eier Methoden zur Proteinisolierung	58
4.4	Te	stung vers	chiedener Immunhistochemie-Protokolle	61
4.5	PF	RG-3- und]	PRG-4-Expression in Zelllinien	62
4.6	PF	RG-3-Expro	ession im sich entwickelnden Gehirn der Ratte	63
4.	.6.1	Analyse de	es feinmorphologischen Expressionsmusters	
		von PRG	3	67
4.	.6.2	Immunhist	tochemische Verteilung von PRG-3	

4

		im postnatalen Rattengehirn	72
	4.7	PRG-3 wird von Interneuronen exprimiert	76
	4.8	Expression von PRG-3 im Cerebellum	78
	4.9	Identifizierung von PRG-3 in der neuronalen Konnektivität	79
	4.10	PRG-3-Expression in Gliazellen	83
	4.11	Die ultrastrukturelle Lokalisation von PRG-3 im Hippocampus	85
	4.12	PRG-4-Expression im sich entwickelnden Gehirn der Ratte	87
	4.	2.1 Analyse des feinmorphologischen Expressionsmusters von PRG-4	90
	4.	2.2 Immunhistochemische Verteilung von PRG-4	
		im postnatalen Rattengehirn	94
	4.13	PRG-4-Expression in Interneuronen	96
	4.14	PRG-4-Expression im Cerebellum	98
	4.15	PRG-4 wird stark in Dendriten exprimiert	99
	4.16	PRG-4 ist nicht axonal lokalisiert	100
	4.17	PRG-4 ist nicht präsynaptisch lokalisiert	101
	4.18	PRG-4-Expression in Gliazellen	103
	4.19	Die ultrastrukturelle Lokalisation von PRG-4 im Hippocampus	104
5	Disku	ssion	106
5	Disku 5.1	ssion Die polyklonalen Antikörper gegen PRG-3 und PRG-4	106
5	Disku 5.1	ssion Die polyklonalen Antikörper gegen PRG-3 und PRG-4 sind spezifisch	106 106
5	Disku 5.1	ssion Die polyklonalen Antikörper gegen PRG-3 und PRG-4 sind spezifisch 1.1 Generierung von polyklonalen Antikörpern	106 106 107
5	Disku 5.1 5	ssion Die polyklonalen Antikörper gegen PRG-3 und PRG-4 sind spezifisch 1.1 Generierung von polyklonalen Antikörpern 1.2 Spezifität der Antikörper	106 106 107 107
5	Disku 5.1 5 5	ssion Die polyklonalen Antikörper gegen PRG-3 und PRG-4 sind spezifisch 1.1 Generierung von polyklonalen Antikörpern 1.2 Spezifität der Antikörper 5.1.2.1 Beide Antikörper erkennen ihr Bindungspeptid	106106107107107
5	Disku 5.1 5 5	ssion Die polyklonalen Antikörper gegen PRG-3 und PRG-4 sind spezifisch 4.1 Generierung von polyklonalen Antikörpern 4.2 Spezifität der Antikörper 5.1.2.1 Beide Antikörper erkennen ihr Bindungspeptid 5.1.2.2 Anwendbarkeit der Antikörper	 106 107 107 107 108
5	Disku 5.1 5 5	ssion Die polyklonalen Antikörper gegen PRG-3 und PRG-4 sind spezifisch 1.1 Generierung von polyklonalen Antikörpern 1.2 Spezifität der Antikörper 5.1.2.1 Beide Antikörper erkennen ihr Bindungspeptid 5.1.2.2 Anwendbarkeit der Antikörper 5.1.2.3 Erste immunhistochemische Färbungen	 106 107 107 107 108 108
5	Disku 5.1 5 5	 ssion Die polyklonalen Antikörper gegen PRG-3 und PRG-4 sind spezifisch 4.1 Generierung von polyklonalen Antikörpern 4.2 Spezifität der Antikörper 5.1.2.1 Beide Antikörper erkennen ihr Bindungspeptid 5.1.2.2 Anwendbarkeit der Antikörper 5.1.2.3 Erste immunhistochemische Färbungen PRG-3 zeigt eine dynamische Expression während 	 106 107 107 107 108 108
5	Disku 5.1 5.2	 ssion Die polyklonalen Antikörper gegen PRG-3 und PRG-4 sind spezifisch 4.1 Generierung von polyklonalen Antikörpern 4.2 Spezifität der Antikörper 5.1.2.1 Beide Antikörper erkennen ihr Bindungspeptid 5.1.2.2 Anwendbarkeit der Antikörper 5.1.2.3 Erste immunhistochemische Färbungen PRG-3 zeigt eine dynamische Expression während der Gehirnentwicklung 	 106 107 107 107 108 108 109
5	Disku 5.1 5.2 5.2	 ssion Die polyklonalen Antikörper gegen PRG-3 und PRG-4 sind spezifisch 1 Generierung von polyklonalen Antikörpern 2 Spezifität der Antikörper 5.1.2.1 Beide Antikörper erkennen ihr Bindungspeptid 5.1.2.2 Anwendbarkeit der Antikörper 5.1.2.3 Erste immunhistochemische Färbungen PRG-3 zeigt eine dynamische Expression während der Gehirnentwicklung 2.1 Expression von PRG-3 im sich entwickelnden Kortex 	 106 107 107 107 108 108 109 110
5	Disku 5.1 5.2 5.2 5.2	 ssion Die polyklonalen Antikörper gegen PRG-3 und PRG-4 sind spezifisch 1.1 Generierung von polyklonalen Antikörpern 2.2 Spezifität der Antikörper 5.1.2.1 Beide Antikörper erkennen ihr Bindungspeptid 5.1.2.2 Anwendbarkeit der Antikörper 5.1.2.3 Erste immunhistochemische Färbungen PRG-3 zeigt eine dynamische Expression während der Gehirnentwicklung 2.1 Expression von PRG-3 im sich entwickelnden Kortex 2.2 Expression von PRG-3 im sich entwickelnden Hippocampus 	 106 107 107 107 108 108 109 110 111
5	Disku 5.1 5.2 5.2 5.2 5.2	 ssion Die polyklonalen Antikörper gegen PRG-3 und PRG-4 sind spezifisch 1.1 Generierung von polyklonalen Antikörpern 2.2 Spezifität der Antikörper 5.1.2.1 Beide Antikörper erkennen ihr Bindungspeptid 5.1.2.2 Anwendbarkeit der Antikörper 5.1.2.3 Erste immunhistochemische Färbungen PRG-3 zeigt eine dynamische Expression während der Gehirnentwicklung 2.1 Expression von PRG-3 im sich entwickelnden Kortex 2.2 Expression von PRG-3 im sich entwickelnden Hippocampus 2.3 Expression von PRG-3 im sich entwickelnden Cerebellum 	 106 107 107 107 108 108 109 110 111 112
5	Disku 5.1 5.2 5.2 5.2 5.2 5.2 5.2 5.3	 ssion Die polyklonalen Antikörper gegen PRG-3 und PRG-4 sind spezifisch <i>1</i> Generierung von polyklonalen Antikörpern <i>2</i> Spezifität der Antikörper <i>5.1.2.1 Beide Antikörper erkennen ihr Bindungspeptid</i> <i>5.1.2.2 Anwendbarkeit der Antikörper</i> <i>5.1.2.3 Erste immunhistochemische Färbungen</i> PRG-3 zeigt eine dynamische Expression während der Gehirnentwicklung <i>2.1 Expression von PRG-3 im sich entwickelnden Kortex</i> <i>2.2 Expression von PRG-3 im sich entwickelnden Hippocampus</i> <i>2.3 Expression von PRG-3 im sich entwickelnden Cerebellum</i> PRG-4 wird konstant während der Gehirnentwicklung exprimiert 	 106 107 107 107 108 108 109 110 111 112 112
5	Disku 5.1 5.2 5.2 5.2 5.2 5.2 5.2 5.3 5.3	ssion Die polyklonalen Antikörper gegen PRG-3 und PRG-4 sind spezifisch 1.1 Generierung von polyklonalen Antikörpern 1.2 Spezifität der Antikörper 5.1.2.1 Beide Antikörper erkennen ihr Bindungspeptid 5.1.2.2 Anwendbarkeit der Antikörper 5.1.2.3 Erste immunhistochemische Färbungen PRG-3 zeigt eine dynamische Expression während der Gehirnentwicklung 2.1 Expression von PRG-3 im sich entwickelnden Kortex 2.2 Expression von PRG-3 im sich entwickelnden Hippocampus 2.3 Expression von PRG-3 im sich entwickelnden Kortex 2.4 Wird konstant während der Gehirnentwicklung exprimiert 3.1 Expression von PRG-4 im sich entwickelnden Kortex	 106 107 107 107 108 108 109 110 111 112 112 112 112
5	Disku 5.1 5.1 5.2 5.2 5.2 5.2 5.2 5.2 5.2 5.2 5.2 5.2	 ssion Die polyklonalen Antikörper gegen PRG-3 und PRG-4 sind spezifisch 1 Generierung von polyklonalen Antikörpern 2 Spezifität der Antikörper 5.1.2.1 Beide Antikörper erkennen ihr Bindungspeptid 5.1.2.2 Anwendbarkeit der Antikörper 5.1.2.3 Erste immunhistochemische Färbungen PRG-3 zeigt eine dynamische Expression während der Gehirnentwicklung 2.1 Expression von PRG-3 im sich entwickelnden Kortex 2.2 Expression von PRG-3 im sich entwickelnden Cerebellum PRG-4 wird konstant während der Gehirnentwicklung exprimiert 3.1 Expression von PRG-4 im sich entwickelnden Kortex 3.2 Expression von PRG-4 im sich entwickelnden Kortex 	 106 107 107 107 108 108 109 110 111 112 112 112 112 112 112 112 112

	5.4 Lo	okalisationsanalysen von RPG-3 und PRG-4	113
	5.4.1	Endogene Expression von PRG-3 und PRG-4 in Zelllinien	113
	5.4.2	PRG-3 und PRG-4 werden spezifisch von Neuronen exprimiert	114
	5.4.3	PRG-3 wird nicht in Gliazellen exprimiert, PRG-4 wird in	
		Oligodendrozyten exprimiert	115
	5.5 PI	RG-3 und PRG-4 sind in synaptischen Strukturen lokalisiert	116
	5.5.1	PRG-3 ist überwiegend im Zellsoma und in Dendriten lokalisiert	116
	5.5.2	PRG-4 wird stark dendritisch exprimiert	118
	5.6 Au	usblick	119
6	Zusamm	enfassung	120
7	Literatur		122
	Leber	nslauf	135
	Dank	sagung	136
	Selbs	tändigkeitserklärung	137

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
BSA	Bovine Serum Albumin
CA	Cornu ammonis
CNPase	2', 3'-cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase
СР	Kortikale Platte
DAB	Diaminobenzidin
DG	Gyrus dentatus
DP	Dentale Platte
E	Embryonaltag
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EGTA	Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
EPSC	Excitatory Postsynaptic Current
FCS	Fetal Calf Serum
GABA	Gamma-aminobutyric Acid
GAP43	Growth Associated Protein 43
GCL	Körnerzellschicht
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GFP	Green Fluorescent Protein
GLAST	Glutamate Aspartate Transporter
Hi	Hilus
HP	Hippocampale Platte
HS	Horse Serum
IB4	Isoleucine B4
iml	Innere Molekularschicht
IZ	Intermediäre Zone
LIS 1	Lissencephaly protein 1(Lis 1)
LPP	Lipid Phosphate Phosphatase
LPA	Lysophosphatidic Acid
MAP	Microtubuli- associated Protein
ML	Molekularschicht
mRNA	Messanger RNA
MZ	Marginalzone

Ncl.	Nucleus
NeuN	Neuronal Nuclei
NG2	Neuro-glial Proteoglycan
NGS	Normal Goat Serum
O4	Oligodendrocyte 4
oml	Äußere Molekularschicht
Р	Postnataltag
PB	Phosphate Buffer
PBS	Phosphate buffered Saline
PBST	Phosphate Buffered Saline Tween-20
PC	Purkinjezelle
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRG	Plasticity Related Gene
PSA-Ncam	Polysialylated-neural Cell Adhesion Molecule
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Str. lacmol.	Stratum lacunosum-moleculare
Str. luc.	Stratum lucidum
Str. or.	Stratum oriens
Str. rad.	Stratum radiatum
SVZ	Subventricular Zone
Tau 1	Tubulin-associated Unit
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VGat	Vesicular GABA Transporter
VGlut	Vesicular Glutamate Transporter
VZ	Ventricular Zone
ZNS	Zentrales Nervensystem

Einleitung 1

1. Einleitung

Der Mensch beschäftigt sich seit tausenden Jahren mit der Steuerung und Lokalisation von Bewusstsein, Intellekt, Sprache und Emotionen. Hippokrates beschrieb als erster, dass u.a. das Denken, die Sinneseindrücke, Bewegungen, Emotionen, Geisteskrankheiten und Delirien vom Gehirn generiert und gesteuert werden [1].

Mit der Entwicklung der ersten Lichtmikroskope Anfang des 17. Jahrhunderts konnten Gewebe mikroskopisch untersucht werden [2]. Die feinmorphologische Erforschung des zentralen Nervensystems rückte aufgrund der Möglichkeiten, das Gewebe mikroskopisch untersuchen zu können Anfang des 19. Jahrhunderts vermehrt in das wissenschaftliche Interesse. 1837 war Johannes E. Purkinje der erste Forscher, der Nervenzellen im Cerebellum beschrieb, die einen langen Dendritenbaum und ein dünnes Axon aufwiesen [3]. Trotz immer besser werdender Färbetechniken und Hilfsmittel gelang es erst Camillo Golgi 1873 mit seiner neuen Färbemethode, der Silbernitratimprägnation, einzelne Neurone und deren Fortsätze sowie Gliazellen in einer guten Qualität kontrastreich zu visualisieren [4]. Er postulierte, dass die Fortsätze der Neurone eine nutritive Funktion einnehmen. Golgi war der Meinung, dass Neurone über ihre Axone in Analogie zum Gefäßsystem miteinander verschmolzen seien und ein sog. Retikulum bilden. Er vertrat damit die von Gerlach mit formulierte *Reticular Theory* [1, 4, 5, 6].

Mit der Optimierung der Färbemethode nach Golgi durch Santiago Ramon y Cajal begann die moderne Neurowissenschaft. Er untersuchte Gewebe von kleinen beziehungsweise juvenilen Säugetieren, deren Myelinisierung entweder nicht sehr dicht war oder noch nicht begonnen hatte. Aufgrund dessen war dieses Gewebe in der histologischen Aufbereitung einfacher zu verarbeiten und die neuronalen Strukturen konnten genauer und sauberer dargestellt werden [4, 6, 7]. Cajal zeigte auch in Färbungen mit Methylenblau, dass dendritische *Spines* keine Artefakte in der Golgi-Färbung waren, sondern reale zelluläre Komponenten von Neuronen darstellten [7]. Er vertrat im Gegensatz zu Golgi die Theorie, dass jedes Neuron eine Einheit darstellt, Neurone über nicht sichtbare Spalträume miteinander kommunizieren und eine Übertragung dieser Informationen nur unilateral erfolgt [4, 5, 6].

Mit der Entwicklung von Elektronenmikroskopen in den 30iger Jahren des 20. Jahrhunderts konnte die Existenz des bereits im 18. Jahrhundert beschriebenen "unsichtbaren Spalts" zwischen kommunizierenden Neuronen und anderen Zellen ultrastrukturell gezeigt werden [8]. Durch die ultrastrukturelle Darstellung von Gehirngewebe wurde verifiziert, dass, wie Cajal es beschrieb, eine Diskontinuität zwischen den Neuronen im Bereich der prä- und postsynaptischen

Membran vorlag, Neurone von einer Plasmamembran umgeben waren und Axone aus sog. *Growth Cones* hervorgingen [7, 8].

Mit der Etablierung molekularbiologischer, proteinbiochemischer und elektrophysiologischer Untersuchungsmethoden und die immer werdende besser Auswertungsund Verarbeitungssoftware in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurde nun das Interesse der Neurowissenschaften auf die genetischen Grundlagen und die proteinbiochemischen Regulationsprozesse der Gehirnentwicklung, der Gehirnschädigung und die damit verbundenen Degenerations- und Regenerationsmechanismen fokussiert. Trotz des immer besseren Verständnisses vieler Prozesse der Gehirnentwicklung und Degenerationsund Regenerationsmechanismen sind viele dieser Mechanismen heute noch unverstanden. Das Ziel ist es, diese Prozesse zu erforschen und zu entschlüsseln, um zukünftig kausale Therapieansätze bei z.B. ischämischen und traumatischen Schädigungen oder genetisch bedingten Fehlbildungen entwickeln zu können.

1.1 Zellulärer Aufbau des Zentralnervensystems

Das zentrale Nervensystem (ZNS) bei Vertebraten setzt sich aus dem Gehirn und dem Rückenmark zusammen. Das ZNS ist das komplizierteste und komplexeste Organ des Vertebraten. Es steuert sämtliche Vorgänge im Körper und dient der Kommunikation des Lebewesens mit sich und seiner Umwelt [9, 10].

1.1.1 Neurone

Im ZNS werden neuronale und nicht neuronale Zellen unterschieden. Neurone, die ca. 10% der Zellen darstellen, dienen der Weiterleitung und Speicherung von Informationen kodiert als elektrische oder biochemische Signale. Neurone sind spezialisierte Zellen, die durch ihre polarisierten Fortsätze, mindestens einem Dendriten und dem Axon, charakterisiert werden [11, 12].

1.1.1.1 Dendriten

Dendriten sind Ausstülpungen des Zytoplasmas. Zusammen mit dem Perikaryon empfangen sie synaptisch vermittelte chemische Signale und verarbeiten diese in postsynaptische elektrische Impulse. Sie verjüngen und verzweigen sich in der Peripherie und weisen an ihren Enden Auftreibungen mit einer sog. postsynaptischen Membran auf, mit denen der Informationsaustausch über Neurotransmitter stattfindet. Sie verfügen an ihrer Oberfläche oft über Dornen, sog. *Spines* [12,13].

1.1.1.2 Axone

Axone sind im Vergleich zu Dendriten wesentlich dünner und werden je nach ihrem Durchmesser, außer im Bereich des Initialsegments, von einer Myelinscheide umhüllt. Sie können sog. Kollateralen ausbilden. Das Axoplasma besteht vornehmlich aus dicht gepackten Intermediärfilamenten und Mikrotubuli. In der Regel besitzt jedes Neuron nur ein Axon. Das Axon dient der raschen Weiterleitung von Informationen über elektrische Impulse. Nach dem "Alles-oder-Nichts-Prinzip" wird ein Aktionspotential am Axonhügel, dem Ursprung des Axons am Perikaryon, ausgelöst und entlang des Axons fortgeleitet [11].

1.1.1.3 Synapsen

Synaptische Endigungen sind Kontaktzonen zwischen kommunizierenden Zellen. Dabei können Neurone untereinander oder z.B. mit Muskelzellen oder endokrinen Zellen kommunizieren [11]. Es werden chemische und elektrische Synapsen unterschieden. Bei chemischen Synapsen erfolgt die Signalübertragung durch Neurotransmitter. Dabei wird durch ein Aktionspotential eine Ausschüttung von Neurotransmittern aus Vesikeln in den synaptischen Spalt ausgelöst. Bei elektrischen Synapsen wird die Information direkt über sog. *Gap Junctions*, die als Porenkanal die Neurone miteinander verbinden, übertragen [11, 14].

1.1.1.4 Morphologische und funktionelle Untergliederung von Neuronen

Neurone lassen sich nach morphologischen und funktionellen Gesichtspunkten untergliedern [12]. Die Photorezeptoren der Retina sind beispielsweise unipolar, da sie nur einen Fortsatz, das Axon, besitzen. Neurone der Spinalganglien sind pseudounipolar. Das Axon und der Dendrit fusionieren hier vor dem Perikaryon zu einem Fortsatz. Bipolare Neurone verfügen über ein Axon und einen Dendriten, was bei vielen Sinneszellen vorkommt. Die meisten Neurone sind allerdings multipolar, dass heißt, sie besitzen ein Axon und multiple Dendriten. Multipolare Neurone können weiter in Golgi-Typ I- Zellen, die ein langes Axon und viele verzweigte Dendriten aufweisen und in Golgi- Typ II- Zellen, die ein kurzes Axon und viele verzweigte Dendriten aufweisen, unterteilt werden [11, 14]. Neurone weisen eine große Varianz der Größe und Form ihrer Somata, der Länge ihrer Axone und Aufzweigung ihrer Dendriten und Axone auf. Die Größe des Somas kann je nach Neurontyp zwischen 5 und 120 µm, und die Länge des Axons kann zwischen wenigen Mikrometern und einem Meter variieren [11, 15]. Pyramidenzellen des Kortex, Purkinjezellen des Cerebellums oder Motoneurone des Rückenmarks zeigen jeweils eine charakteristische Form [15]. Korbzellen des Cerebellums

haben z. B. ein den Namen gebendes korbartig verzweigtes Axon, das die Purkinjezellen umgibt [16].

Funktionell können Neurone auch in Projektionsneurone, z.B. Motoneurone, die mittels eines langen Axons ihre Information in weiter entfernte Regionen des ZNS oder in die Peripherie senden und Interneurone, die zwischen Projektionsneuronen Informationen über ein kürzeres Axon austauschen und sie damit regulieren, unterschieden werden [17, 18]. Eine weitere Einteilung nach den verschiedenen Neurotransmittern, die eine exzitatorische, inhibitorische oder modulierende Wirkung implizieren, erscheint klinisch relevant, da hiervon z. B. mögliche pharmazeutische Behandlungskonzepte abhängen.

<u>1.1.2 Gliazellen</u>

Gliazellen, die ca. 90% aller Zellen des ZNS darstellen, sind unter anderem für die Aufrechterhaltung der Homöostase verantwortlich und bei der Informationsweiterleitung und - verarbeitung beteiligt [19, 20]. Gliazellen exprimieren eine Reihe von Rezeptoren und Ionenkanälen, wie z.B. nikotinische Azetylcholinrezeptoren [9, 21].

Es werden Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia unterschieden, die wiederum anhand ihrer Funktionen und Lokalisation weiter unterteilt werden können [11].

1.1.2.1 Astrozyten

Astrozyten sind sternförmige Zellen, die zahlreiche Fortsätze besitzen und mit ihren Ausläufern über die Membrana limitans gliae superficialis und perivascularis eine Grenzmembran zur Pia mater und zu den intrazerebralen Gefäßen darstellen. Darüber erfolgt die Ernährung der Neurone, die Regulation des Flüssigkeits- und Kaliumhaushalts, des pH- Wertes, die Aufnahme und der Abbau von Neurotransmittern und die Aufrechterhaltung der Bluthirnschranke [6]. Sie werden in fasrige und protoplasmatische Astrozyten unterschieden. Fasrige Astrozyten besitzen lange und schmale Fortsätze, wohingegen protoplasmatische Astrozyten über dickere und kürzere Fortsätze verfügen, die stark verzweigt sind [14].

Radiale Gliazellen sind transient vorkommend, gehen aus neuroepithelialen Zellen hervor und stellen neuronale Progenitorzellen dar [22, 23]. Cajal-Retzius-Zellen werden Gliazellen genannt, die in der Marginalzone im sich entwickelnden Kortex und Hippocampus lokalisiert sind. Das Axon dieser Zellen zweigt sich horizontal in der Marginalzone auf. Durch ihre Expression, z.B. der Gene Reelin oder LIS1, beeinflussen sie die Migration von Neuronen während der Neurogenese [24]. Im Cerebellum werden radiale Gliazellen Bergmanngliazellen genannt, die im Unterschied zum Kortex und Hippocampus auch im adulten Stadium persistieren [12].

Astrozyten werden u.a. bei Ischämien oder bei Traumen aktiviert. Sie werden dann als reaktive Astrozyten bezeichnet und sind später an der Ausbildung der Glianarbe beteiligt [25]. Astrozyten bilden außerdem das gliale fibrilläre saure Protein (GFAP), das sowohl als Marker für hirneigene Tumore, den Gliomen gilt, als auch zur immunhistochemischen Lokalisation von Astrozyten genutzt werden kann [26 - 28].

1.1.2.2 Oligodendrozyten

Oligodendrozyten und im peripheren Nervensystem die Schwannzellen sind Gliazellen, deren am besten verstandene Funktion die Bildung von Myelinscheiden, welche die Axone umhüllen, ist. Ihre Fortsätze bilden das Myelin aus, das die Axone isoliert und dadurch eine schnelle saltatorische Signalweiterleitung erlaubt [29]. Wie viele Fortsätze eines Oligodendrozyten Axone umhüllen, variiert innerhalb der Regionen im ZNS und von Spezies zu Spezies. Das Myelin eines Axons stammt von verschiedenen Oligodendrozyten. Im Gegensatz dazu umhüllt immer nur eine Schwannzelle ein Axon im peripheren Nervensystem. Oligodendrozyten bleiben ein Leben lang teilungsfähig und lassen sich durch diverse Antikörper, die gegen spezifische Oberflächenmoleküle dieser Zellen gerichtet sind, immunzytochemisch visualisieren. Sie können morphologisch, z.B. nach der Dicke der Myelinscheiden, eingeteilt werden [30, 31].

1.1.2.3 Mikroglia

Die Soma der Mikroglia sind kleiner als Astrozyten oder Oligodendrozyten, die oft als Pendant zu den Mikroglia als Makroglia bezeichnet werden. Diese Zellen besitzen zahlreiche, verzweigte Fortsätze. Es wird davon ausgegangen, dass Mikrogliazellen nicht, wie die anderen Gliazellen aus dem Ektoderm, sondern aus dem Mesoderm entstammen und von blutbildenden Zellen durch Migration während der Embryonalentwicklung in das ZNS gelangen. Sie gehören zu den immunpotenten Zellen des ZNS [32, 33]. Unter physiologischen Bedingungen zeigen sie ein schmales Soma und fein verzweigte Fortsätze. Unter pathologischen Bedingungen werden sie aktiviert, proliferieren und phagozytieren Material. Sie verlieren dann ihre Fortsätze und nehmen die Morphologie von Makrophagen an. Sie können als antigenpräsentierende Zellen fungieren [34, 35].

1.1.3 Ependym

Ependymzellen sind Epithelzellen, die das Ventrikelsystem und den Zentralkanal auskleiden. Die Zellen des Plexus choroideus sind spezialisierte Ependymzellen, die den Liquor cerebrospinalis produzieren. Sie gehen aus neuroepithelialen Zellen hervor [12].

1.2. Aufbau des Kortex, Hippocampus und Cerebellums

Die embryonale und postnatale Entwicklung, die Morphologie und die funktionelle Organisation des Kortex, des Hippocampus und des Cerebellums sind relativ gut erforscht. Insbesondere der Hippocampus, als ein Teil des Archikortex, und das Cerebellum besitzen einen einfachen und vielfach beschriebenen feinmorphologischen Aufbau und eignen sich deshalb besonders gut als Modell für Lokalisationsstudien. In diesen Regionen wurden die Proteine PRG-3 und PRG-4 feinmorphologisch im sich entwickelnden Gehirn der Ratte untersucht. Es wird deshalb hier auf den prinzipiellen Aufbau und die prinzipiellen Entwicklungsprozesse dieser drei Regionen detaillierter eingegangen.

<u>1.2.1 Kortex</u>

Das Großhirn (Telencephalon) verarbeitet sämtliche Sinneseindrücke, wie z.B. visuelle, auditorische und taktile Reize und leitet sie an das Bewusstsein weiter. Außerdem ist das Telencephalon für die Willkürmotorik, das Sprechvermögen, das Sprachverständnis und die Sprachproduktion sowie die Entstehung und Verarbeitung von Emotionen verantwortlich [6, 11]. Der Neokortex ist der entwicklungsgeschichtlich jüngste Teil des Kortex und besteht aus sechs Schichten. Der Archikortex und der Paleokortex, phylogenetisch ältere Teile des Kortex, sind drei- bis fünfschichtig aufgebaut. Zum Paleokortex gehören Regionen, die zum Riechhirn zählen und der Kortex, der die Amygdala umgibt [6, 11]. Zum Archikortex zählt das sog. limbische System, das verschieden gegliedert werden kann. Es besteht aus dem Gyrus cinguli, dem Gyrus parahippocampalis, dem Hippocampus mit dem Gyrus dentatus und der Fimbria hippocampi, der Area subcallosa, dem Induseum griseum und der Striae longitudinales laterales und mediales, dem Fornix, dem Corpus mammillare, der Amygdala und der Kerngebiete der Area septalis. Dem limbischen System werden funktionell Aufgaben der Emotionsregulation und -steuerung, aber auch intellektuelle Verarbeitungsmechanismen zugeordnet, außerdem erfolgt hier die Ausschüttung endogener Opioide [6, 11].

Der sechsschichtige Neokortex wird in die Molekularschicht (I), die äußere Körnerschicht (II), die äußere Pyramidenschicht (III), die innere Körnerschicht (IV), die innere Pyramidenschicht (V) und die multiforme Schicht (VI) gegliedert. Die Molekularschicht enthält vor allem Dendriten und Axone tieferliegender Neurone und wenige Interneurone. Die äußere Körnerschicht enthält vornehmlich kleine Pyramidenzellen. Die innere Körnerschicht besteht vor allem aus Interneuronen. Die äußere Pyramidenschicht enthält Pyramidenzellen, die ihre Informationen innerhalb des Kortex weiterleiten. In der inneren Pyramidenschicht befinden sich große Pyramidenzellen, die ihre Axone in kortexferne Areale senden. In der multiformen Schicht liegen Pyramidenzellen und Interneurone, deren Fortsätze sowohl zu Kortexarealen als auch zu Arealen außerhalb des Kortex ziehen [6, 11].

1.2.2 Hippocampus

Die hippocampale Formation setzt sich aus dem Gyrus dentatus, dem Cornu ammonis, dem Subiculum, dem Präsubiculum, dem Parasubiculum und dem Entorhinalkortex zusammen [11]. Der Hippocampus befindet sich im medialen Temporallappen. Er ist Teil des limbischen Systems und u.a. bei der Verarbeitung und dem Bewusstwerden von verschiedenen Sinneseindrücken beteiligt. Im Hippocampus finden der Transfer und die Vorverarbeitung von Gedächtnisinhalten vom Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis statt. Er ist als Teil des Archikortex dreischichtig aufgebaut. Dabei setzt sich das Cornu ammonis aus dem Stratum oriens, Stratum pyramidale, Stratum radiatum und dem Stratum lacunosum-moleculare zusammen. Der Gyrus dentatus wiederum besteht aus der inneren und äußeren Molekularschicht, der Körnerzellschicht und dem Hilus [36, 37, Abbildung 1.1].

Im Cornu ammonis befinden sich exzitatorische Pyramidenzellen in der sog. CA1- und CA3-Region. Im Gyrus dentatus befinden sich exzitatorische Körnerzellen. Innerhalb des Cornu ammonis und im Gyrus dentatus befinden sich ebenfalls hemmende Interneurone [37, 38]. In der hippocampalen Formation projizieren afferente Axone von Neuronen aus der Kortexschicht II des Entorhinalkortex über den Tractus perforans in die äußere Molekularschicht des Gyrus dentatus und zum Stratum lacunosum- moleculare der CA3-Region. Dabei durchlaufen diese Fasern auf dem Weg zum Hippocampus das Subiculum und geben auch Afferenzen an dieses ab. Axone aus der Kortexschicht III des Entorhinalkortex enden im Stratum lacunosum- moleculare der CA1-Region. Neurone, die in tieferen Schichten des Entorhinalkortex lokalisiert sind, projizieren zur inneren Molekularschicht, zu den Körnerzellen des Gyrus dentatus und zum Hilus des temporalen Teils des Gyrus dentatus. Teile des Tractus perforans treten auch als Projektionen vom Entorhinalkortex über den Alveus in die septale Region der CA1-Region des Hippocampus ein. Ein Teil dieser Projektionen gelangen in das Stratum lacunosum- moleculare der kontralateralen CA1-Region [38, 39, 40, Abbildung 1.1]. In der inneren Molekularschicht enden Axone von weiteren Körnerzellen und Pyramidenzellen der CA3-Region, des Hilus und Fasern des Gyrus dentatus der kontralateralen Seite.



Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Faserverbindungen im adulten Hippocampus, modifiziert nach [148]. EC Entorhinalkortex (Schicht II und III), PP Tractus perforans (braun), DG Gyrus dentatus, CA1 und CA3 Cornu ammonis Regionen, C/A kommissurale und assoziative Afferenzen (gelb), Sept septale Afferenzen (grün), a Alveus, o Stratum oriens, p Stratum pyramidale, r Stratum radiatum, slm Stratum lacunosum- moleculare, gcl Körnerzellschicht, iml innere Molekularschicht, oml äußere Molekularschicht, Moosfasertrakt (rosa), Schafferkollateralen (pink)

Die Axone der Körnerzellen des Gyrus dentatus bündeln sich im Hilus zum sog. Moosfasertrakt und ziehen als infrapyramidales Bündel zum Stratum radiatum der CA3-Region des Cornu ammonis. Im äußeren Stratum radiatum verbinden sich afferente Fasern der Hippocampi beider Hemisphären und senden weitere Fasern als Fornix zu diversen Kerngebieten des Hirnstamms. Als Schaffer-Kollateralen enden weitere Axone der CA3-Region an den Dendriten der Pyramidenzellen der CA1-Region. Die Axone der Pyramidenzellen der CA1-Region projizieren auch in das Subiculum. Das Subiculum selbst projiziert u.a. in den Nucleus accumbens, die Amygdala und den präfrontalen Kortex. Dabei finden zahlreiche Modulationen der exzitatorischen Signale durch inhibitorische Interneurone in der gesamten hippocampalen Formation statt [38 - 42].

1.2.3 Cerebellum

Das Cerebellum besteht aus zwei Hemisphären, mit jeweils drei paarigen Hirnschenkeln, dem Vermis, dem Flocculus, dem Nodulus und den Kleinhirntonsillen. Im Marklager unter der Kleinhirnrinde befinden sich vier Paare von Kleinhirnkernen. Es sind der Ncl. dentatus, Ncl. fastgii, Ncl. emboliformis und Ncl. globosus. Das Kleinhirn spielt eine Rolle bei der Planung, Feinjustierung und Koordination der Willkür- und Extrapyramidalmotorik, dem Erlernen von Bewegungen und der Diskriminierung der Sensibilität. Zudem ist es in kognitive Prozesse involviert [43, 44].



Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Verbindungen im adulten Cerebellum, modifiziert nach [149]. CN tiefe Kerngebiete, GC Körnerzellen, Go Golgi-Zellen, PC Purkinjezellen, BC Korbzellen, SC Sternzellen, MF Moosfasern, CF Kletterfasern, PF Parallelfasern, ML Molekularschicht, PCL Purkinjezellschicht, GCL Körnerzellschicht

Feinmorphologisch kann die Kleinhirnrinde in ein Stratum moleculare, ein Stratum granulosum und eine Purkinjezellschicht eingeteilt werden. Im Stratum moleculare befinden sich vor allem Dendriten diverser Neurone, vor allem aber der Purkinjezellen, exzitatorische Axone der Körnerzellen, die dann als sog. Parallelfasern parallel zur Längsachse der Kleinhirnfurchung verlaufen, Korbzellen und Sternzellen, die als Interneurone eine inhibitorische Funktion ausüben [45, Abbildung 1.2]. Darüber hinaus laufen als Afferenzen entlang der Dendritenbäume der Purkinjezellen exzitatorische Fasern, sog. Kletterfasern, die vom Nucleus olivaris inferior entspringen. Von Golgi-Zellen des Stratum granulosum steigen ebenfalls inhibitorische Axone in das Stratum moleculare. Die Purkinjezellschicht besteht aus den Zellkörpern der Purkinjezellen und Golgi-Zellen. Sog. Moosfasern erreichen als exzitatorische Axone, die aus der Pons, der Formatio reticularis, dem Nucleus vestibularis, dem Tectum, dem unteren Hirnstamm und dem Rückenmark stammen, die Körnerzellen [45 – 48, Abbildung 1.2].

Einleitung 10

1.3 Entwicklung des Kortex, Hippocampus und Cerebellums

Am anatomisch-morphologischen Beispiel von Nagetieren sollen nun die verschiedenen Entwicklungsschritte erklärt werden.

Das zentrale Nervensystem entsteht aus dem Ektoderm. Aus diesem entsteht die Neuralplatte, die sich wiederum lateral faltet, sodass Neuralfalten und eine Neuralrinne entstehen. Wenn sich die Neuralfalten berühren und anschließend verschmelzen, entsteht das Neuralrohr. Aus dem Neuralrohr entwickeln sich dann drei primitive Hirnbläschen, aus diesen nachfolgend das Gehirn und das Rückenmark hervorgehen [11].

Die Neurogenese beginnt bei Nagetieren ab dem 9. bis 10. Embryonaltag [22]. Bereits zu diesem Entwicklungsstadium können das Telencephalon, das Diencephalon, das Mesencephalon, das Metencephalon und Myelencephalon unterschieden werden [48]. Die Neuralplatte und das Neuralrohr bestehen aus einem mehrreihigen, aber einschichtigen Epithel aus neuroepithelialen Zellen, auch primäre Progenitorzellen genannt. Astrozyten, Oligodendrozyten und Neurone gehen aus den gleichen neuronalen Stammzellen hervor [23].

Die prinzipiellen Abläufe der Neurogenese in den Regionen Kortex, Hippocampus und Cerebellum werden nachfolgend detaillierter erläutert.

1.3.1 Neurogenese im Kortex

Der Kortex entsteht aus einem der drei Hirnbläschen, dem Prosencephalon, das sich später in Telencephalon und Diencephalon teilt. Die Ausbildung der Kortexschichtung findet bei Nagetieren zwischen dem 11. bis 18. Embryonaltag statt [49]. Wenn die postmitotischen Neurone ihren Zielort in den Kortexschichten erreicht haben, durchlaufen sie eine terminale Differenzierung. Somit entstehen während der Neurogenese immer mehr postmitotische und ausdifferenzierte Neurone [23, 49, 50]. Solange sich die neuroepithelialen Zellen symmetrisch teilen, entstehen bei jeder Teilung wieder neuroepitheliale Stammzellen. Diese Zellen liegen dann als Epithel den Seitenventrikeln, als ventrikuläre Zone, an. Wenn neuroepitheliale Zellen beginnen Kontakt zum sich entwickelnden vaskulären System an der apikalen Zone (Pia mater) aufzunehmen, indem sie ihre Tight Junctions in Adherens Junctions transformieren, spricht man von einer Umwandlung dieser Zellen in radiale Gliazellen [22, 23]. Es kommt zu einer asymmetrischen Teilung mittels eines spezialisierten Differenzierungsvorgangs. Es entstehen dabei radiale Gliazellen, intermediäre Progenitorzellen und erste Neurone. Über der ventrikulären Zone bildet sich ab dem 11. Embryonalstadium eine Präplatte, die unter der Pia mater liegt und durch erste einwandernde Neurone entsteht [49, 51, 52]. Sowohl neuroepitheliale Stammzellen als auch radiale Gliazellen zeigen während des Zellzyklus eine Migration ihres

Zellkerns durch ihre apikal und basale Polarität. Dies findet vor allem zu frühen Zeitpunkten der Neurogenese statt. Der Zellkern wandert basal zur ventrikulären Zone, um dann die Synthesephase zu durchlaufen. Dieser Vorgang wird interkinetische nukleäre Migration genannt [22, 23, 52]. Zu einem späteren Zeitpunkt der Neurogenese migrieren die intermediären Progenitorzellen für die Mitose nicht mehr vollständig in die ventrikuläre Zone. Sie verbleiben apikal und bilden die subventrikuläre Zone [22, 23, 53]. In dieser subventrikulären Zone kommt es vor allem zu symmetrischen Teilungen der intermediären Progenitorzellen, um den Zellpool zu vermehren.



Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Kortikogenese bei Nagetieren, aus [150]. Im ersten Schritt formt sich die Präplatte (PP) über der ventrikulären Zone (VZ), links. In einem zweiten Schritt migrieren erste Neurone in die Präplatte. Durch die kontinuierliche Migration wird die Präplatte in eine Marginalzone (MZ) und Subplatte (SP) gespalten und die kortikale Platte (CP) bildet sich aus, Mitte. E Embryonalstadium, PS piale Oberfläche, SVZ subventrikuläre Zone, IZ Intermediärzone, WM weiße Substanz

Ab dem 13. Embryonaltag entstehen weitere postmitotische Neurone, die dann in die kortikale Platte einwandern. Sie teilen dabei die Präplatte in eine Marginalzone, in der Cajal-Retzius Zellen lokalisiert sind und eine Subplatte. Dazwischen befindet sich die kortikale Platte [22, 49 -53]. Die auch Lokomotion genannte Migration nimmt in der finalen Entwicklungsphase an Geschwindigkeit ab [52]. Durch die radiale Migration entsteht eine Schichtung des Kortex und auch des Hippocampus und des Kleinhirns als sog. *Inside-out Layering* [49, Abbildung 1.3]. Die Tochterzellen nutzen die elterlichen radialen Gliazellen, um an diesen entlang in die kortikale Platte zu wandern. Die Marginalzone, die unter der Pia mater lokalisiert ist, entsteht durch die Fortsätze der neuroepithelialen Zelle und die Cajal-Retzius-Zellen [49]. Projektionsneurone stammen vornehmlich aus dem dorsalen Telencephalon. GABAerge Interneurone bilden sich ebenfalls aus radialen Gliazellen und Progenitorzellen, allerdings in erster Linie aus der ventrikulären Zone im ventralen Telencephalon und aus der subpallialen ganglionären Eminenz außerhalb des sich entwickelnden Kortex und wandern später in diesen ein [54].

1.3.2 Neurogenese im Hippocampus

Der Hippocampus beginnt sich als Teil des Telencephalons in Nagetieren während der mittleren Embryonalphase zu entwickeln. Die Neurone der hippocampalen Formation entstehen vornehmlich während der Embryonalphase [55 - 58]. Ähnlich wie im Neokortex entstehen Progenitorzellen aus neuroepithelialen Zellen der ventrikulären Zone [56 - 58]. Die Schichten des Entorhinalkortex bilden sich während dem 15. und 18. Embryonaltag von innen nach außen aus [59]. Im Parasubiculum und Präsubiculum findet die Neurogenese zwischen dem 15. und 19. Embryonaltag statt [59]. Es werden drei morphologisch verschiedene neuroepitheliale Komponenten im sich entwickelnden Hippocampus beschrieben; das Neuroepithelium des Ammonshorns, des Gyrus dentatus und der Fimbria. Aus dem Neuroepithelium der Anlage des Gyrus dentatus beginnen zwischen dem 14. bis zum 19. Embryonaltag Progenitorzellen der Körnerzellen zu migrieren und aggregieren in einer zweiten Keimzone [60 - 62]. Vom 19. Embryonaltag bis zum Zeitpunkt der Geburt wandern diese Zellen in den Gyrus dentatus. Dabei ordnen sich die älteren Zellen oberflächlich und die jüngeren Zellen tiefer an. Während dessen wird eine dritte Keimzone im sich entwickelnden Hilus angelegt. Während der Perinatalperiode sind diese Zellen stark proliferativ [60 - 63]. Aus dieser später subgranulär genannten Zone können noch im adulten Tier neue Körnerzellen entstehen [60, 64]. Während der Migrationsphasen unterstützen transient vorkommende Cajal-Retzius-Zellen die Wanderung der Zellen entlang von radialen Gliazellen, in dem sie u.a. chemoattraktive Proteine, wie z.B. Reelin exprimieren [65 - 67].

1.3.3 Neurogenese im Cerebellum

Das Cerebellum entwickelt sich zusammen mit dem Pons aus den Rhombomeren des Metencephalons [46, 47]. Erste Entwicklungsprozesse beginnen im Cerebellum ab dem 9. Embryonaltag [48]. Ab dem 17. Embryonaltag beginnt sich die typische Faltung des Cerebellums auszubilden [48]. Zum Zeitpunkt der Geburt sind bereits erste synaptische Verschaltungen zu identifizieren [45, 48, 68]. Mit der terminalen Differenzierung der Neurone etablieren sich die einzelnen synaptischen Verschaltungen der Zellen. Mit dem 16. postnatalen Tag sind alle verschiedenen Zelltypen in Schichten angeordnet und die Verschaltungen der Zellen untereinander und mit Regionen außerhalb des Cerebellums sind etabliert [48, 68]. Im Gegensatz zum sich entwickelnden Kortex proliferieren Zellen aus neuroepithelialen Zellen nicht ausschließlich im Bereich der ventrikulären Zone. Es existiert eine zweite Keimzone, die äußere Körnerzellschicht genannt wird [45]. Diese setzt sich aus den Progenitorzellen der Körnerzellen und einigen Vorläuferzellen der Neurone der Kerngebiete zusammen, die aus dem

Rhombomer-Bereich in diese Schicht migrieren. Dieser Prozess findet etwa um den 15. Embryonaltag statt. Um den Geburtszeitraum differenzieren diese Zellen zu reifen Körnerzellen und beginnen über radiale Gliazellen (Bergmanngliazellen und Cajal-Retzius-Zellen) in eine innere Körnerzellschicht zu migrieren. Die Proliferation der Körnerzellen setzt etwa mit dem 10. Embryonaltag ein. Die Proliferation und Migration der Körnerzellen dauert bis etwa zum 15. bis 20. postnatalen Tag an. Die Vorläuferzellen der Purkinjezellen migrieren ebenfalls aus der ventrikulären Zone und bilden postnatal ihre charakteristischen Dendritenbäume aus. Die Purkinjezellen regulieren dabei die Proliferation der Progenitorzellen der Körnerzellen [45]. Einige Vorläuferzellen der Neurone der Kerngebiete und die meisten Progenitorzellen der Interneurone beginnen zwischen dem 11. und 13. Embryonaltag zu proliferieren und wandern dann in den ersten zwei postnatalen Wochen von der ventrikulären Zone in ihre finalen Gebiete, die cerebelläre Platte, die Molekularschicht bzw. in die Kerngebiete ein [45, 48]. Es kommt jedoch in der spätembryonalen Phase bzw. früh postnatal nicht zu einer Stagnation der Neurogenese [54]. Eine sogenannte sekundäre Neurogenese findet während der gesamten postnatalen Phase in der subventrikulären Zone des Kortex, im Gyrus dentatus des Hippocampus und in der äußeren Körnerzellschicht des Cerebellums statt und persistiert bis in das Erwachsenenalter [54, 69 - 73].

1.3.4 Gliogenese

Die Gliogenese beginnt etwa zeitgleich mit der Neurogenese [74]. Astrozyten und Oligodendrozyten gehen ebenfalls aus radialen Gliazellen hervor. Am Ende der Neurogenese transformieren sich die meisten radialen Gliazellen bei Säugetieren in Astrozyten [12, 22]. Die Morphologie der radialen Gliazellen ändert sich von einer bipolaren in eine unipolare und schließlich in eine multipolare Zelle, die keinen Kontakt mehr zum Ventrikel hat [22]. Diese Transformation wird in den meisten Regionen des Zentralnervensystems angenommen [22]. Bei Nagetieren wird dieser Prozess in bestimmten Gehirnregionen postnatal fortgesetzt. Dabei verbleiben die meisten zu Astrozyten transformierten Zellen in der Region, in der sich die Fortsätze der radialen Gliazellen befanden [22]. Es ist bisher unbekannt, ob Gliazellen von primären Progenitorzellen oder von intermediären Progenitorzellen ausgehen [22]. Aus einer radialen Gliazelle können ein Neuron und ein Astrozyt oder ein Oligodendrozyt hervorgehen. Im Rückenmark entstehen oligodendrogliale Progenitorzellen aus der ventralen ventrikulären Zone. Im ventralen Telencephalon wurden Vorläufer von Oligodendrozyten in der ventrikulären Zone der ventralen entopeduncularen Zone ab dem Embryonaltag E16 in Mäusen gefunden. Eine Subpopulation dieser Oligodendrozyten, die von Progenitorzellen ausgehen, migriert in den

dorsalen Kortex und Hippocampus. Sie differenzieren dann dort aus. Postnatal behalten Gliazellen ihre Proliferationsfähigkeit bei [22, 75].

1.3.5 Regulierende Faktoren der Entwicklung des ZNS

Seit Jahren ist man daran interessiert, die unbegrenzten molekularen Mechanismen der Entwicklung des Zentralnervensystems weiter zu entschlüsseln und die regulierenden Moleküle zu entdecken. Die enorme Bedeutung dieses Forschungsbereiches wird bewusst, wenn bedacht wird, dass mit neuen Erkenntnissen der Entwicklungsprozesse des Zentralnervensystems genetische Ursachen angeborener Fehlbildungen entschlüsselt werden können. Moleküle, die während der Entwicklung reguliert werden und in Entwicklungsprozesse involviert sind, werden nach einer Schädigung re-exprimiert [76, 77]. Demzufolge ermöglichen die Erforschung von Schädigungsprozessen des juvenilen und adulten Zentralnervensystems und die Untersuchung von Regenerationsprozessen des Zentralnervensystems die Entwicklung weiterer Therapieansätze. In diesem Abschnitt werden einige Beispiele von Molekülen und ihre Regulierung und Kontrolle der Entwicklung des ZNS erläutert.

Während der Entwicklung des Nervensystems und der Ausdifferenzierung von Neuronen und Gliazellen bilden sich auch die neuronalen Fortsätze, Dendriten und Axone, durch Veränderungen im Actin-Zytoskelett aus. Im Entorhinalkortex wird das erste Aussprossen von Axonen in den Hippocampus bereits ab dem 17. Embryonaltag bei Nagetieren beobachtet, obwohl der Hauptanteil der Entwicklung und Aussprossung von Fortsätzen und die Ausbildung von Synapsen zum Zeitpunkt der Geburt und in den ersten drei bis fünf Tagen nach der Geburt stattfindet [78, 79]. Die Synaptogenese ist als Etablierung neuronaler Netzwerke eng mit der neuronalen Differenzierung verknüpft [10]. Dabei beeinflussen u.a. Signalmoleküle, Zelladhäsionsmoleküle und extrazelluläre Matrixmoleküle sowohl die korrekte Wegfindung des Axons als auch die synaptische Verknüpfung. Ob eine Verbindung etabliert wird oder wieder verloren geht, hängt von der synaptischen Aktivität ab und wird durch gewebeabhängige Regulationsmechanismen erreicht [10]. Dabei werden eine Attraktion oder Repulsion entweder durch kontaktabhängige Moleküle oder über chemotrophe Moleküle erreicht [80]. Es gibt zahlreiche intra- und extrazelluläre Proteine und Makromoleküle, die durch attraktive oder repulsive Impulse die Migration der Neurone zu ihrem Ziel leiten. Im adulten Gehirn befinden sich drei Regionen; die subventrikuläre Zone, die subgranuläre Zone im Gyrus dentatus und die äußere granuläre Zone des Cerebellums, die bis ins adulte Alter die Neurogenese durch neurale Progenitorzellen erlauben [54, 69, 73, 81].

Zu Beginn der kortikalen Neurogenese werden Mikrotubuli und Intermediärfilamente durch Expression von beispielsweise Nestin und Vimentin akquiriert. Des Weiteren beginnen die Progenitorzellen astrogliale Marker, wie z.B. GLAST oder astrogliale Intermediärfilamente, wie GFAP, zu exprimieren. Damit haften diese u.a. durch Adhäsionskomplexmoleküle polarisierten Zellen dann wie Gliazellen am Endothel des sich entwickelnden Gefäßsystems [22]. Neurogene Gene kodieren für Faktoren, die die Transkription von Regulatorproteinen der Neurogenese initiieren. Das Glykoprotein Reelin ist u.a. an der Migration und Differenzierung von Progenitorzellen während der Entwicklung im Kortex, Cerebellum und Hippocampus als chemoattraktives Molekül beteiligt. Es gibt neuere Daten, die zeigen, dass Reelin in der Umgebung von Läsionen hochreguliert wird und damit die adulte Neurogenese mit initiieren kann [82]. Die mikrotubuli- assoziierten Proteine LIS 1 und Doublecortin sind bei der Migration des Zellkerns in den neuroepithelialen Zellen und radialen Gliazellen beteiligt. Wenn sich Progenitorzellen asymmetrisch teilen, wird Doublecortin in den reifen Neuronen herunter reguliert. Dafür beginnen die Neurone das als Marker für reife Neurone verwendete Protein NeuN zu exprimieren [83]. Fehlt LIS 1, kommt es zum Stillstand der Zellkernmigration, dadurch zum Stopp des Zellzyklus und zu weniger Zellproliferationen [22]. Bei der axonalen Wegfindung durch Modifikationen im Zytoskelett sind sezernierte Proteine, wie z.B. Netrine, Slit 1 und 2, Ephrine oder Semaphorine, als auch kontaktabhängige Proteine, wie z.B. Zelladhäsionsmoleküle, Cadherine, Integrine und Moleküle der extrazellulären Matrix beteiligt [84 - 90]. GAP 43 (Neuron Growth- associated Protein 43) ist ein Protein, dass während des Auswachsen von Axonen hochreguliert und stark im Wachstumskegel von Axonen exprimiert wird und dem damit eine Schlüsselrolle in der Ausbildung von Neuriten zukommt [91].

1.4. Lipid Phosphatasen/Phosphotransferasen

Bereits in den 60iger Jahren wurden membran-assoziierte Phosphatidat Phosphatase Aktivitäten identifiziert [92]. Phosphatidat Phosphatasen (PAP) hydrolysieren Phosphatidat (PA) zu Diacylglycerol (DAG) [93 - 96]. Die als PAP-1 benannte Phosphatidat Phosphatase ist vorwiegend im Zytosol lokalisiert. Das Enzym wird Mg²⁺-abhängig und durch die Translokation in das endoplasmatische Reticulum aktiviert und kann durch N-ethylmaleimid inaktiviert werden. Das physiologische Substrat ist Phosphatidat (PA) [96, 97]. Im Jahr 1991 wurde ein als PAP-2 beschriebenes Enzym in Säugetieren charakterisiert, das vornehmlich in der Plasmamembran lokalisiert ist, Mg²⁺-unabhängig arbeitet und nicht N-ethylmaleimid sensitiv ist [94 - 99]. Die PAP-2 hydrolysieren *in vitro* im Gegensatz zu den PAP-1 relativ unspezifisch eine

breite Anzahl von Phospholipiden, wie z.B. Phosphatidat (PA), Lysophosphatidat (LPA), Ceramid 1-phosphat (C-1-P), Sphingosin 1-phosphat (S-1-P) und Diacylglycerol Pyrophosphat (DAG pyrophosphat). Das veranlasste 1998 die Forschergruppe von D. Brindley und D. W. Waggoner zur Umbenennung dieser Ektoenzyme in Lipid Phosphat Phosphatasen (LPP) [97, 99].

Neben der Identifizierung der Sphingosin 1-Phosphat Phosphatasen (SPPs) [100] wurden nachfolgend drei weitere Proteingruppen entdeckt, die Sphingomyelin Synthasen (SMSs), die Lipid Phosphatase-related Proteins/ Plasticity Related Genes (LPR/PRGs) und die Type 2 Candidate Sphingomyelin Synthasen (CSS2s) [92]. Allen Proteingruppen gemeinsam ist die allgemeine Topologie ihrer Transmembrandomänen mit charakteristischen Unterschieden ihrer jeweiligen Sequenzen der katalytischen Domänen und der N- und C-Termini [92]. Aufgrund dieser phylogenetischen Homologien der Aminosäuresequenzen ihrer Transmembrandomänen wurden die Lipid Phosphat Phosphatasen (LPPs), die Sphingosin 1-Phosphat Phosphatasen (SPPs), die Glucose 6-Phosphatase, die Sphingomyelin Synthasen (SMSs), die Lipid Phosphatase-related Proteins/ Plasticity Related Genes (LPR/PRGs) und die Type 2 Candidate Sphingomyelin Synthasen (CSS2s) von der Forschergruppe um A. J. Morris zu einer Gruppe, den Lipid Phosphatasen/Phosphotransferasen, zusammengefasst [92, 97, 101, Abbildung 1.4, A].

Im Folgenden wird aufgrund enger Verwandtschaftsbeziehungen der PRGs mit den LPPs und möglicher sich ergänzender oder voneinander abhängiger Funktionen im Phospholipidstoffwechsel näher auf die Struktur, Expression und Funktionen dieser Proteine und ihrer Substrate eingegangen.

1.4.1 Lipid Phosphat Phosphatasen und ihre Substrate

1.4.1.1 Struktur, Lokalisation und Expression der LPPs

Es sind bisher drei Isoformen und eine *Splicing*-Variante der LPPs bei Vertebraten identifiziert worden [92, 96, 97, 101]. LPPs besitzen sechs Transmembrandomänen mit drei katalytischen Zentren, die sich auf der zweiten und dritten Schleife auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran bzw. auf der luminalen Seite in intrazellulären Membransystemen befinden [92, 99, 101, 102]. Der C-Terminus liegt intrazellulär und der N-Terminus zeigt eine Glykosylierungsstelle. Diese strukturellen Eigenschaften erklären, dass diese Enzyme ihr aktives Zentrum extrazellulär bzw. luminal besitzen [97]. Die Aminosäuresequenzen von rLPP-1 und hLPP-2 weisen mehrere putative Phosphorylierungsseiten auf. Wohingegen in der LPP-3 Sequenz keine Äquivalente vorkommen. Diese Unterschiede weisen auf eine vielfältige

posttranslationale Regulation der Isoformen hin [96]. Die Domänen der drei katalytischen Zentren sind innerhalb der Isoformen und innerhalb von den untersuchten Spezies (Maus, Ratte und Mensch) hochkonserviert [96, 97, 99]. In Überexpressionsstudien bzw., wenn verfügbar, Analysen mittels LPP-Antikörpern wurde zusätzlich gezeigt, dass die LPPs in der Plasmamembran und im endoplasmatischen Reticulum lokalisiert sind [103 - 106]. Für LPP-1 und LPP-3 wurde nachgewiesen, dass sie in sog. *Lipids Rafts*, Membrandomänen, die gegenüber Detergenzien resistent sind, rekrutiert werden können [107]. Während die mRNA-Expression von LPP-1 und LPP-3 in fast allen humanen Geweben gefunden wurde, zeigt sich eine weniger starke und begrenzte mRNA-Expression von LPP-2 in Geweben [92, 108].



Abbildung 1.4: A Vergleich der Aminosäuresequenzen der LPT Familie: Es zeigen sich eindeutige phylogenetische Homologien der PRGs mit den LPPs, phylogenetischer Stammbaum aus [92]. B: Proteinstruktur von LPP-1, C: PRG-1, D: PRG-3 und E: PRG-4 als Kugelmodell in der Zellmembran, modifiziert nach [99]. Alle Proteine besitzen sechs putative Transmembrandomänen und nach intrazellulär gerichtete N- und C-Termini. Besonders ist der lange C- Terminus von PRG-1 und -2, der bei den anderen PRGs und LPP-1 nicht vorkommt.

Die Analyse von LPP-3 auf Proteinebene und auf mRNA-Ebene und von LPP-1 auf mRNA-Ebene ergab eine starke Expression im Gehirn und peripheren Nervensystem. Das LPP-3-Protein wird zusätzlich auch stark in der Niere und Lunge exprimiert [96, 108]. Die mRNA von LPP-2 ist geringer im zentralen Nervensystem vorhanden, dafür aber in höheren Konzentrationen im Kolon, Pankreas, Uterus, Ovar und in der Plazenta [92, 110 - 111].

Während LPP-1- und LPP-2-Knockout-Mäuse phänotypisch fast unauffällig, lebensfähig und fertil erscheinen, sind homozygote LPP-3 Knockout Mäuse bereits frühembryonal nicht lebensfähig aufgrund von schweren Defekten der Gefäßbildung [109]. LPP-2-Knockout-Mäuse haben eine reduzierte LPA-Phosphataseaktivität und ein erhöhtes LPA-Level im Plasma. LPP-1-Knockout-Mäuse zeigen eine reduzierte Expression von LPP-1. Einzige Ausnahme ist das Gehirn [106, 112, 113]. Die selektive Ausschaltung von LPP-3 im zentralen Nervensystem von Mäusen zeigt lebensfähige und fertile Tiere, die durch eine fehlerhafte Zytoarchitektur der Bergmanngliazellen, in denen LPP-3 normalerweise exprimiert wird, Störungen der postnatalen Entwicklung des Cerebellums aufweisen [114].

1.4.1.2 Bioaktive Phospholipide und ihre Funktionen

Phospholipide, wie PA, LPA, S1P oder C1P, sind bioaktive Mediatoren und normale Zellmembranbestandteile, die aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens ein breites Wirkungsspektrum aufweisen. Sie beeinflussen eine Reihe von biologischen Prozessen, wie z.B. die Neurogenese, Angiogenese und Atherosklerose, Wundheilung, Asthmaentstehung, Bildung von Fibrosen, Entwicklung von Adipositas, die Entstehung von malignen Neubildungen oder Entzündungsreaktionen. Auf zellulärer Ebene regulieren Phospholipide beispielsweise die Zellmigration, Zellproliferation, Zellaggregation, Änderung des Zytoskeletts (z. B. Neuritenretraktion) und den Schutz vor Apoptose [115 - 124].

Das bisher am besten untersuchte Phospholipid ist LPA [124]. Die physiologische Konzentration von LPA im Serum liegt ca. zwischen 1-5 µM. LPA liegt im Serum vornehmlich gebunden an Albumin und Fatty Acid-binding Protein (FABP) vor und entstammt zum größten Teil von Thrombozyten [125, 126]. Bereits 1979 wurde von Schumacher *et al.* beschrieben, dass PA und LPA eine Thrombozytenaggregation im Plasma hervorrufen [127]. *In vitro* konnte in Zelllinien gezeigt werden, dass LPA zu einer Retraktion von Neuriten und in Spinalganglien zu einem Kollaps des Wachstumskegels führt [128, 129]. In Astrozyten kann LPA die Zellmorphologie verändern und die Zellen zur Proliferation anregen, was zu einer Gliose führt [130, 131]. Eine *ex vivo* Exposition eines embryonalen Kortex der Maus mit LPA führte zu einer Faltung, ähnlich der Gyrierung, und zu einem Dickenwachstum. Dieses Wachstum war bedingt durch verminderte Apoptosen und verlängerte Mitosephasen der neuronalen Progenitorzellen [132].

1.4.1.2.1 LPA- Rezeptoren

Die Signalübertragung der bioaktiven Phospholipide erfolgt über G-Protein gekoppelte Rezeptoren oder über davon unabhängige Mechanismen [133]. Mit der Entdeckung des ersten LPA-Rezeptors und der mitogenen Eigenschaften von LPA auf Fibroblasten begann die Ära der Erforschung von LPA [131]. Schließlich wurde 1996 der erste LPA-Rezeptor (vormals vzg-1 bzw. edg-1 genannt) im sich entwickelnden Kortex im Bereich der ventrikulären Zone identifiziert und kloniert [134]. Es sind bis dato drei LPA-Rezeptoren, fünf S1P-Rezeptoren und drei weitere LPA-Rezeptoren, die jedoch nur eine geringe phylogenetische Verwandtschaft mit den anderen Rezeptoren ausweisen und bevorzugt Nukleotide anstatt LPA binden, bekannt [135]. Die LPA-Rezeptoren werden in allen Geweben mit einer höchsten Konzentration im zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert [124]. Jeder LPA-Rezeptor hat sieben Transmembrandomänen und ist an jeweils verschiedene G-Proteine gekoppelt, die durch Second Messenger intrazelluläre Signalkaskaden vermitteln [136]. Die Expression der Rezeptoren ist nicht redundant und weißt eine für jeden Rezeptor spezifische Dynamik auf. Während LPA1 bereits frühembryonal im ZNS exprimiert wird, weshalb ihm auch eine Rolle bei der Kortikogenese zugeschrieben wurde, wird LPA₂ transient frühembryonal bis früh postnatal exprimiert. Um den Geburtstermin herum zeigt LPA₃ einen Höhepunkt der Expression, welche postnatal bis in das Erwachsenenalter wieder abnimmt [136].

1.4.1.2.2 Metabolismus von Phospholipiden

Unter physiologischen Bedingungen wird von dem Enzym Autotaxin (lysoPLD) z.B. Lysophosphatidylcholin (LPC) gebildet. Autotaxin wurde ursprünglich als Motilitätsfaktor aus Melanomzellen isoliert und wird zur Familie der Nukleotid Pyrophosphatasen/ Phosphodiesterasen (NPPs) als NPP-2 gezählt. Im Jahr 2002 entdeckten Tokumura et al., dass lysoPLD und Autotaxin ein identisches Protein darstellen und dass Autotaxin im Gegensatz zu NPP-1 und NPP-3 vorwiegend LPC in LPA umwandelt [137]. Es liegt im Plasma in löslicher Form und intrazellulär in Vesikeln und in der Plasmamembran vor [131]. Autotaxin wird in zahlreichen Geweben exprimiert mit den höchsten Konzentrationen im Gehirn, in den Ovarien, in der Lunge, im Darm und in der Niere [131]. Homozygote Autotaxin Knockout Mäuse sind aufgrund von schweren Gefäßfehlbildungen bereits früh embryonal letal. Heterozygote Tiere waren hingegen lebensfähig, fertil und wiesen außer niedrigeren LPA-Serumkonzentrationen phänotypisch keine Auffälligkeiten auf [138]. Unter pathologischen Bedingungen kann LPA auch durch das Enzym Phospholipase A2 (PLA₂) generiert werden. Dabei wird PA in Mikrovesikeln an der Zelloberfläche von Leukozyten exponiert, welches die PLA₂ dann zu LPA hydrolysiert [131].

1.4.1.3 Regulation des Verhältnisses bioaktiver Phospholipide und ihrer dephosphorylierten Metabolite durch Lipid Phosphat Phosphatasen

Die LPPs regulieren durch ihre Hydrolase-Aktivität das Verhältnis von bioaktiven Phospholipiden und ihren zum Teil ebenfalls bioaktiven Metaboliten. [101, 108]. Sie dephosphorylieren bioaktive Phospholipide, wie z.B. LPA oder S1P, und können sie damit inaktivieren oder andere bioaktive Metabolite erzeugen. Die Metabolite sind dann in der Lage, die Zellmembran in das Zellinnere durchdringen [92, 97, 102].

Eine Überexpression von LPP-3 und LPP-1 erhöht auch die Dephosphorylierung von exogenem PA oder LPA. Bei der Tumorgenese von Ovarialkarzinomen konnte gezeigt werden, dass nach Überexpression von LPP-3 und durch die Dephosphorylierung von LPA ein vermindertes Tumorzellwachstum und eine erhöhte Apoptoserate. Dieser Effekt war gegenteilig, wenn ein LPA Analogon, dem gegenüber LPP-3 resistent war, eingesetzt wurde [92, 139]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass LPA die Aktivität von LPP-1 in Thrombozyten anregt, was nachfolgend zu einer Reduzierung der LPA-Akkumulation und LPA induzierten Thrombozytenaggregation führte [140]. Die extrazellulären Phospholipide können direkt rezeptorvermittelt oder durch ihre bioaktiven Metabolite als Second Messenger verschiedene Signaltransduktionswege in der Zelle auslösen. Demzufolge regulieren die LPPs und das Autotaxin durch ihre Enzymaktivität das Gleichgewicht zwischen extrazellulären und intrazellulären Phospholipiden und ihren Metaboliten und beeinflussen damit mögliche Signalwege und den intrazellulären Lipidstoffwechsel in der Zelle.

1.5 Plasticity Related Genes

Die molekularen Mechanismen der Entwicklung und der Regenerationsfähigkeit nach Schädigung des ZNS sind bisher nur unvollständig verstanden. Die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Nitsch (Charité) erforscht genau diese Mechanismen und darauf Einfluss nehmende Moleküle während der Entwicklung und nach einer entorhinalen Kortexläsion (ECL). Im Jahr 2003 entdeckten Bräuer *et al.* in einem *Screening Assay* von *sprouting*- relevanten Genen ein Gen, das im Hippocampus und im Entorhinalkortex nach Schädigung durch eine ECL hochreguliert wird, während der Entwicklung gehirnspezifisch exprimiert wird und axonales Aussprossen ermöglicht [141]. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde dieses Gen Plasticity Related Gene 1 (PRG-1) genannt [141]. Humanes PRG-1 besteht aus 763 Aminosäuren (AS) und zeigt Sequenzhomologien seiner sechs hydrophoben Transmembrandomänen zu den Lipid Phosphat Phosphatasen (LPP), was die Eingruppierung dieses Proteins in die LPP Superfamilie erlaubte [92, 141, Abbildung 1.4]. Anhand von Hydrophobizitätsanalysen konnte vorhergesagt werden, dass der ca. 400 AS lange C-Terminus hydrophil ist und dementsprechend auf der zytosolischen Seite der Zellmembran lokalisiert sein wird [141, Abbildung 1.4]. Eine Überexpression mit dem Fusionsprotein PRG-1-eGFP *in vitro* in der Zelllinie N1E-115 zeigte einen Schutz vor einer Neuritenretraktion nach Exposition mit LPA. Gleichzeitig war das MAG, ein Metabolit von LPA, extrazellulär fünffach erhöht. Dem gegenüber waren die Zellen, die ein punktmutiertes Fusionsprotein nach Austausch des Histidins (His252) in der Domäne C2 aufwiesen, nicht mehr gegenüber der LPA-Exposition resistent und vollzogen eine Neuritenretraktion. Extrazellulär konnte kein MAG nachgewiesen werden [141]. Diese Beobachtungen führten zu dem Schluss, dass PRG-1 LPA direkt moduliert [141].

Erste Untersuchungen von homozygoten PRG-1-Knockout-Mäusen zeigten, dass die Tiere eine juvenile Epilepsie ausbilden, ein reduziertes Körpergewicht ausweisen und zu ca. 50 % nach der dritten bis vierten Lebenswoche verstarben [142]. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass PRG-1 im Hippocampus spezifisch in exzitatorischen Synapsen von glutamatergen Neuronen lokalisiert ist. Es wurde postuliert, dass die erhöhte Anfallsneigung durch eine Imbalance zwischen inhibitorischen und exzitatorischen Vorgängen während der Entwicklung in Knockout Mäusen bedingt ist [142].

Bei Sequenzdatenvergleichen wurden vier weitere Mitglieder der Plasticity Related Gene Familie entdeckt, die alle vertebraten- und gehirnspezifisch exprimiert werden [92, 143].

Alle Plasticity Related Genes haben sechs N-terminale Transmembrandomänen und einen hydrophilen und damit intrazellulären C-Terminus. Humanes PRG-2 besteht aus 746 AS und besitzt, wie PRG-1, einen ca. 400 AS langen C-Terminus. Humanes PRG-3 besteht aus 325 AS, PRG-4 aus 343 AS und PRG-5 aus 316 AS. PRG-3 bis PRG-5 besitzen einen kurzen, ca. 50 AS langen hydrophilen C-Terminus [92, 143 - 146]. Die Sequenzhomologien der PRGs innerhalb der Spezies Mensch, Maus und Ratte liegen bei über 90 %. Zum Beispiel ist die Sequenz des humanen PRG-1 mit dem PRG-1 der Ratte zu 93 % identisch. Die Sequenz des humanen PRG-3 ist zu 96 % mit dem PRG-3 der Ratte und die Sequenz des humanen PRG-4 zu 95 % mit dem PRG-4 der Ratte identisch [143]. Das errechnete Molekulargewicht von PRG-3 (Rattus norvegicus) liegt bei 35,887 kDa und von PRG-4 (Rattus norvegicus) bei 36,936 kDa [BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), http://www.uniprot.org].

Durch hohe Sequenzhomologien der Transmembrandomänen der PRGs zu den Transmembrandomänen der Lipid Phosphat Phosphatasen wurden diese in die LPP Superfamilie

bzw. LPT Familie eingruppiert. Deswegen werden sie auch Lipid Phosphatase Related Protein (LPR) genannt. Der lange C- Terminus von PRG-1 bzw. PRG-2 zeigt hingegen keine phylogenetische Ähnlichkeit mit den Lipid Phosphat Phosphatasen [92, 143, BLAST].

Im Jahr 2004 wurde durch Savaskan et al. gezeigt, dass das überexprimierte PRG-3 in vitro in neuronalen und nicht neuronalen Zelllinien Veränderungen in der Zellmorphologie induziert [144]. Es moduliert ein Wachstum von Filopodien bzw. führt zu einer Verlängerung von Neuriten [144, Abbildung 1.5]. Im Jahr 2006 konnte die Arbeitsgruppe um Andrew J. Morris zeigen, dass PRG-3 wie die GTPase Cdc42 der Rho Familie die Bündelung von Actinfilamenten induzieren kann. Allerdings wurde beobachtet, dass die Filopodien in PRG-3 überexprimierenden Zellen länger, dünner und mobiler waren als in den Kontrollzellen und dass das Filopodienwachstum unabhängig von den bekannten Signalwegen ablief [145, Abbildung 1.5]. Wie PRG-3 die Induktion des Filopodienwachstums moduliert, ist bisher noch nicht verstanden [145].



Abbildung 1.5: Obere Reihe: PRG-3- eGFP Überexpression (rechts) im Vergleich zur Überexpression von eGFP (links) in COS-7 Zellen, aus [144]. Auffällig erscheint die Veränderung der Zellmorphologie im Vergleich zur Kontrolle. Die Überexpression führt zu einer Vergrößerung des Zellsoma und zur Ausbildung von Fortsätzen an der Zelloberfläche.

Untere Reihe: Überexpression von PRG-3 eGFP (rechts) und eGFP (links) in MVD 7 Zellen, aus [145]. Auch in dieser Abbildung zeigt sich, dass die Überexpression von PRG-3 die Zellmorphologie verändert.

Analysen mittels der *In- situ-* Hybridisierung haben gezeigt, dass die Expression der mRNA von PRG-3 während der Entwicklung dynamisch reguliert wird. PRG-3 wird bereits ab dem 16. Tag der embryonalen Entwicklung im Gehirn von Nagetieren exprimiert und hat einen Höhepunkt seiner Expression um den Geburtstermin. Postnatal sinkt die Expression wieder kontinuierlich ab

[144, Abbildung 1.6]. Ferner wurde beobachtet, dass nach einer neuronalen Überstimulation durch das Glutamatanalogon Kainat die PRG-3-mRNA herunter reguliert wird [144].

Die Möglichkeit einer Ektophosphatase-Aktivität der PRGs wurde mehrfach kontrovers diskutiert [92, 97]. Die Beobachtungen, dass nach Überexpression von PRG-1 in Zelllinien und anschließender Exposition mit LPA eine Neuritenretraktion verhindert wurde, implizierte eine Enzymaktivität für PRG-1 [141]. Die Sequenzvergleiche der für die katalytische Aktivität essentiellen Motive der LPPs mit den PRGs ergaben ausgetauschte, nichtkonservierte Aminosäuren in der ersten und dritten katalytischen Domäne und bei einigen auch in der zweiten Domäne [97]. Im Jahr 2000 konnten Zhang *et al.* nachweisen, dass Mutationen dieser Aminosäuren zu einem Verlust der Enzymaktivität bei LPP-1 führt [147]. Daraus wurde geschlussfolgert, dass die durch die PRGs bisher beobachteten Veränderungen der Zellmorphologie auf eine andere, vielleicht rezeptor-ähnliche Weise moduliert sein könnten.



Abbildung 1.6: Darstellung der dynamischen Expression der PRG-3-mRNA im sich entwickelnden Hippocampus der Wistarratte in der *In-situ*-Hybridisierung [144]. Dabei zeigt sich eine deutliche spätembryonale Expression, die bis zum Stadium P5 besteht und dann während der weiteren postnatalen Entwicklung wieder absinkt.

2. Herleitung der Aufgabenstellung

Bioaktiven Phospholipiden werden bedeutende Einflüsse in zelluläre Wirkmechanismen der Zellproliferation, Zellmigration und Zelldifferenzierung im sich entwickelnden ZNS zugesprochen [115 - 124]. In den letzten Jahren wuchs demnach auch das wissenschaftliche Interesse an den Proteinen, die den Stoffwechsel von Phospholipiden regulieren.

Ziel dieser Arbeit war es am Beispiel zweier Vertreter der Plasticity Related Gene Familie, dem PRG-3 und PRG-4, systematisch und semiquantitativ auf Proteinebene im sich entwickelnden Gehirn der Ratte zu analysieren, um mit diesen erhobenen Daten Erkenntnisse über Einflüsse dieser Proteine in Entwicklungsprozesse des ZNS zu gewinnen.

Vor der systematischen Analyse des PRG-3- bzw. PRG-4-Proteins stand die Identifizierung geeigneter PRG-3- bzw. PRG-4-Antikörper, die Verifizierung ihrer Spezifität und die Etablierung von immunhistochemischen und Immunfluoreszenz-Protokollen.

Mit diesen Antikörpern wurde das Expressionsmuster von PRG-3 und PRG-4 in embryonalen und postnatalen Entwicklungsstadien in den Regionen Kortex, Hippocampus und Cerebellum immunhistochemisch untersucht. Kolokalisationsstudien und ultrastrukturellen Analysen wurden genutzt, um die subzelluläre Verteilung beider Proteine zu identifizieren.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

<u>3.1.1 Reagenzien</u>

Reagenz	Hersteller
Agarose	Peqlab
Ammoniumchlorid	Merck
Ammoniumnickelsulfat	Merck
BSA	Sigma
Cobaltchlorid	Sigma
Complete Proteaseinhibitor	Roth
Diaminobenzidin	Sigma
ECL- Reagenz	Amersham Biosciences
Entellan	Merck
Ethidiumbromid	Roth
FCS	HyClone, PAN
Röntgenfilme	GE Healthcare
Hoechstlösung	Sigma
Horse Serum	PAN
Immu- Mount	Thermo Shandon
Kanamycin	Sigma
L-Glutamin	Invitrogen
Magermilch	Roth
Nitrocellulose Protran BA 85	Whatman
NGS	PAN
NP- 40	Sigma
Paraformaldehyd	Merck
Prestained Protein Marker, Broad Range	New England Biolabs
Protein A Sepharose CL-4B	Amersham Biosciences
Saponin	Sigma
Streptomycin/ Penicillin	PAN
Thimerosal	Sigma
Triton X-100	Sigma
Wassserstoffperoxid	Merck

<u>3.1.2 Kits</u>

Kit	Hersteller
ABC- Elite- Kit	Vestastain
Amaxa Transfektionskit	Amaxa Biosystems
BCA Protein Assay Kit	Perbio
Nucleo Bond PC500 Maxiprep Kit	Macherey& Nagel
µMacs GFP Tagged Protein Isolation Kit	Miltenyi Biotec

<u>3.1.3 Geräte</u>

Geräte	Hersteller
Amaxa Elekroporation	Amaxa Biosystems
EasyCast Mini Model B1A und B2	Owl Separation Systems
Elektrophorese Mini Protean II	BioRad
Elektrophorese Protean II XL	BioRad
Elektronen- Mikroskop EM 900	Zeiss
Fluoreszenz- Mikroskop BX 51	Olympus, Japan
Objektive: 4x, 10x, 20x, 40x, 60x, 100x	
Fluoreszenz- Mikroskop IX81	Olympus, Japan
Geldokumentationsanlage	Intas UV-Systeme
HERAcell CO2 Inkubator	Heraeus
Kamera Axioplan	Zeiss
Kamera Olympus IX-70	Olympus, Japan
Konfokales Laserscanning Mikroskop TCS	Leica
SL, Objektive: 20x, 40x, 60x	
Microm HM 650V	Thermo Scientific
PerfectBlue Semi-Dry Elektroblotter	Peqlab
Power pac 200	BioRad
Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader	BioTek
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	BioRad
ULTRA TURRAX T25 basic	IKA-Werke
Ultramikrotom Ultracut S	Reichert
Ultrazentrifuge Rotor TCA 100.4	Beckmann
Universal Zentrifuge	Hettich
US Autoflow Automatic CO ₂ Inkubator	NuAire
Zentrifugen: 5415R, 5804R	Eppendorf
Zoom Stereomikroskop S6E L2	Leica

<u>3.1.4 Software</u>

Software	Hersteller	
Leica Confocal Software v. 2.61	Leica	
Adobe Photoshop 6.0	Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA,	
	USA	
CorelDRAW 10, 12, X4	Corel Corporation, Ottawa, Kanada	
DNASIS MAX	Hitachi Software Engineering, South San	
	Fransicso, CA, USA	
MetaMorph Systems 6.2r4	Universal Imaging, Downingtown, PA	

3.1.5 Primäre Antikörper

Name	Spezies	Hersteller	Immunblot	IHC, IFH
Anti-ß-Actin	Maus	Sigma, clone AC 15	1:5000	
Anti-Calbindin	Maus	Swant		1:500
Anti-Calretinin	Maus	Chemicon		1:2000
Anti-CNPase	Maus	Sigma, clone 11-5B		1:100
Anti-PRG-3	Kaninchen	nicht kommerziell	1:1000	1:1000

Anti-PRG4	Kaninchen	nicht kommerziell	1:500	1:500
Anti-GFAP	Maus	Boehringer Mannheim	1:2000	1:2000
Anti-eGFP	Maus	Clontech, Jl-8	1:2500	
Anti-Flotillin	Maus	BD		1:25
Anti-GAP43	Maus	Chemicon		1:10.000
Anti-GAPDH	Maus	Acris (abcam)	1:2500	
Anti-IB4-FITC	Maus	Sigma		1:100
Anti-MAP1	Maus	Sigma, clone HM1		1:500
Anti-MAP2	Maus	Sigma, clone HM2		1:500
Anti-MBP	Ratte	Chemicon		1:500
Anti-NG2	Maus	Chemicon		1:500
Anti-Nestin	Maus	Chemicon		1:1040
Anti-NeuN	Maus	Chemicon		1:1000
Anti-Neurofilament	Maus	Sigma		1:200
Anti-O4	Maus	Chemicon		1:200
Anti-Parvalbumin	Maus	Swant		1:5000
Anti-PSA-Ncam	Maus	nicht kommerziell		1:1000
Anti-	Maus	Sysy		1:500
Synaptophysin				
Anti-Tau1	Maus	Chemicon		1:250
Anti-VGlut1	Maus	Chemicon		1:500
Anti-VGlut2	Maus	Chemicon		1:500
Anti-VGat	Maus	Chemicon		1:500

3.1.6 Sekundäre Antikörper

Name	Spezies	Hersteller	Immunblot	IHC	IFH
Anti-Kaninchen	Esel	GE Healthcare	1:5000		
Meerrettichperoxidase					
Anti-Maus	Schaf	GE Healthcare	1:5000		
Meerrettichperoxidase					
AlexaFluor, 488	Ziege	Molecular Probes			1:1000
Anti-Kaninchen					
AlexaFluor, 568	Ziege	Molecular Probes			1:1000
Anti-Kaninchen					
AlexaFluor, 594	Ziege	Molecular Probes			1:1000
Anti-Kaninchen					
AlexaFluor, 488	Ziege	Molecular Probes			1:1000
Anti-Maus					
AlexaFluor, 568	Ziege	Molecular Probes			1:1000
Anti-Maus					
AlexaFluor, 568	Ziege	Molecular Probes			1:1000
Anti-Ratte					
Anti-Kaninchen	Ziege	Vector		1:500	
biotinyliert					
3.1.7 Versuchstiere

Für die immunhistologischen, elektronenmikroskopischen und proteinbiochemischen Untersuchungen wurden terminiert verpaarte männliche Wistarratten aus der Eigenzucht der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM, Berlin, Projekt TzWZ, FEM-Nr. 904) verwendet. Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen in der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin gehalten. Für die immunhistologischen Untersuchungen wurden männliche Wistarratten der Eigenzucht aus der FEM bezogen. Die Anzahl der Versuchstiere wurden auf ein Minimum beschränkt und alle Tiere wurden vor der Präparation tief anästhesiert. Nachfolgend sind die untersuchten Entwicklungsstadien und die Anzahl der Tiere pro Stadium aufgelistet.

Stadium	E16	E17	E18	E21	P0	P5	P10	P15	P20	P25	P30
Anzahl n	10	20	10	20	15	16	9	14	4	1	19

<u>3.1.8 Peptide</u>

Die zur Immunisierung von Kaninchen verwendeten Peptide wurden von der Firma BioGenes synthetisiert und sind tabellarisch aufgelistet.

Peptidbezeichnung	Peptidsequenz
rPRG-3 280-293	C-KGTQGSASKPKPED
rPRG-3 296-310	C-GVPLMAFPRIESPLE
rPRG-3 186-199	C-LEVIEKARRSFPSK
rPRG-3 53-66	C-GDLMKPYPGTEEES
rPRG-4 323-337	C-RIRHRHGSPHPSRRT
rPRG-4 305-319	C-SQAPTMDSPLEKNPR
rPRG-4 157-171	C-HFLSVCRPNYTALGC
rPRG-4 51-68	C-YDSAYAKPYPGPEAASR

3.1.9 Zelllinien und Mikroorganismen

Zelllinie	Spezies	Bezugsquelle	Medium
N1E-115	Maus,	ATCC Nummer CRL-	D- MEM
	Neuroblastoma	2263	1 % Penicillin / Streptomycin
			10 % FCS
HEK 293	Human, Niere	ATCC Nummer CRL-	D- MEM
		1573	200 mM L-Glutamin
			1 % Penicillin / Streptomycin
			10 % FCS
COS-7	Affe, Niere	ATCC Nummer CRL-	D- MEM
		1651	200 mM L-Glutamin
			1 % Penicillin / Streptomycin
			10 % FCS

F-98	Ratte,	ATCC Nummer CRL-	ATCC Medium
	undifferenziertes	2397	4 mM L-Glutamin, 1.5 g/L
	malignes Gliom		Natriumbicarbonat, 4.5 g/L
	-		Glucose, FCS 10 %
BV2	murine, primäre,		D-MEM
	immortalisierte		4 mM L-Glutamin, 4.5 g/L
	Mikroglia		Glucose, FCS 10 %

3.1.10 Vektoren und Überexpressionsplasmide

Die für die Transfektion von COS-7 Zellen verwendeten Überexpressionsplasmide sind nachfolgend aufgelistet.

Vektor	Bezugsquelle
peGFP-N1	Clontech
peGFP-C1	Clontech

Plasmid	Kodiertes Protein	Bezugsquelle
peGFP-N1-rPRG-3	GFP-rPRG-3	Laborsammlung
peGFP-C1-rPRG-3	GFP-rPRG-3	Laborsammlung
peGFP-C1-rPRG-4	GFP-rPRG-4	Laborsammlung

3.1.11 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Zellkultur	
Hepes- Puffer	11,92 g Hepespulver ad 1000 ml dH ₂ O
Einfriermedium	80 % (v/v) FCS, 20 % (v/v) DMSO
N1E-115 Medium	D- MEM, 1 % Penicillin / Streptomycin, 10 % FCS
COS-7 Medium	D- MEM, 200 mM L-Glutamin, 1 % Penicillin / Streptomycin
	10 % FCS
HEK 293 Medium	D- MEM, 200 mM L-Glutamin, 1 % Penicillin / Streptomycin
	10 % FCS
Proteinpräparation	
Lysispuffer für	20 mM Tris, 0,25 M Sucrose, 1 mM EGTA, 5 mM EDTA, 1
Proteinfraktionspräparation	mM PMSF, 50 mM β-Mercaptoethanol, 25 μg/ml Leupeptin, 1
aus Zellen	µl/ml DNase I (Ausgangskonz.: 10 U/µl), 1 µl/ml RNase A
	(Ausgangskonz.: 10 mg/ml), 250 µg/ml Lysozym, (pH 7,5)
Lysispuffer für	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 % Triton x- 100, 0,1 % SDS, 5
Totalproteinpräparation aus	mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 Tbl. Complete Proteaseinhibitor
Gewebe	direkt vor Gebrauch, (pH 7,4)
Lysispuffer für die GFP-	1 M Tris- HCl, 5 M NaCl, 1 % NP- 40 oder 1 % Triton X-100,
Immunpräzipitation	10 % SDS, 0,5 M EDTA, 1 M MgCl ₂ , 0,1 % β-Mercaptoethanol,
	¹ / ₂ Tbl. Complete Proteaseinhibitor direkt vor Gebrauch, (pH 7,4)
SDS-PAGE und Immunblot	
3x Probenpuffer	0,076 g Tris (Base), 1 g Saccharose, 1 g SDS,
	5 mg Bromphenolblau
10x Ponceau-Rot	2 ml Ponceau S, 30 ml Trichloressigsäure
Blotpuffer	14,42 g Glycin, 3,03 g Tris (Base), 20 % Methanol

10x PBS- Puffer	80 g NaCl, 2 g KCl, 14,5 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O, 2,4 g KH ₂ PO ₄ , (pH 7 4)
Trenngelpuffer	181.6 g/l Tris, 4 g/l SDS (pH 8.8)
Sammelgelpuffer	60,6 g/l Tris, 4 g/l SDS (pH 6,8)
Polyacrylamidtrenngel	4 ml Trenngelpuffer, 6,4 ml Acrylamid, 2,56 ml Bisacrylamid;
	3,04 ml Aqua dest. 20 µl Tetramethylendiamin, 160 µl
	Ammoniumpersulfat
Polyacrylamidsammelgel	1,5 ml Sammelgelpuffer, 0,75 ml Acrylamid, 0,3 ml
	Bisacrylamid; 3,45 ml Aqua dest. 7,8 µl Tetramethylendiamin,
	60 μl Ammoniumpersulfat
Coomassie-Färbung	0,05 % Coomassie-Blue R250, 6 % Trichloressigsäure,
	7 % Eisessig, 20 % Methanol
Immunhistochemie und Imm	unfluoreszenz
PFA 4 %	50 ml 0,2 M PB bis auf 72°C erhitzen. 4 g PFA mit 1 M NaOH-
	Lösung klären. 50 ml PFA filtrieren mit 50 ml dH ₂ O ad 100 ml
	auffüllen, pH (7,4)
Agarose 4 %	4 g Agarose, 100 ml 0,1 M PB
0,1 M Phosphatpuffer	68,8 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O, 15,6 g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
Waschpuffer	1 ml FCS, 1 ml 2 % Thimerosal ad 100 ml 0,1 M PB
1 x PBST	1x PBS, 0,3 % Triton X-100, 0.9 % NaCl, pH 7,4
Saponin- Stammlösung	1 g Saponin ad 10 ml 0,1 M PB
Blockierungslösungen	
Saponin-	1 ml 10 % Saponin- Stammlösung, 10 ml FCS ad 100 ml 0,1 M
Blockierungslösung	PB
Triton- Blockierungslösung	1 g BSA 100 µl, Triton X- 100 ad 100 ml 0,1 M PB
Blockierungslösung für	nach Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff: 10 ml FCS ad
schockgefrorenes Gewebe	100 ml 0,1 M PB
Blockierungslösung bei	10 % HS ad 1x PBS
embryonalem Gewebe	
Alkoholreihe	unvergellter 100 % Ethanol, 96 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %,
	Xylol

3.2 Methoden

Die Abbildung 3.1 gibt einen Überblick über die durchgeführten Techniken.



Abbildung 3.1: Übersicht über die durchgeführten proteinbiochemischen und immunhistochemischen Techniken, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Kultur, Passage und Konservierung von Zelllinien

COS-7-Zellen und N1E-115-Zellen wurden in T175-Zellkulturflaschen (175cm^2) in den jeweiligen Medien in 5 %iger CO₂-Atmosphäre, bei 37 °C und bei 95 % Luftfeuchtigkeit im HERAcell[®] CO2 Inkubator kultiviert. Die Zellen wurden bei einer ca. 80-90 %igen Konfluenz, die mikroskopisch kontrolliert wurde, auf ein Viertel passagiert. Die Zellen wurden dazu vorsichtig in 5 ml Medium mit einem Zellschaber von der Zellkulturflasche gelöst. Anschließend wurde die Suspension bei 900 x g bei 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 1 ml Medium resuspendiert und auf neue mit frischem Medium gefüllte Zellkulturflaschen verteilt.

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen bei einer Konfluenz von ca. 80 % entweder in 5 ml Medium abgeschabt oder mit Trypsin behandelt. Dann wurde die Suspension bei 900 x g bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Medium resuspendiert. Dann wurde 1 ml 2 x Einfriermedium beigefügt. Die Suspension wurde in 1 ml Aliquots in Einfrierröhrchen überführt. Die Einfrierröhrchen wurden in einem mit Isopropanol gefüllten Gefrierblock auf –80 °C über Nacht eingefroren und am nächsten Tag in Flüssigstickstoff überführt und gelagert.

3.2.1.2 Transfektion von COS-7-Zellen

3.2.1.2.1 Plasmid-DNA-Isolierung

Die COS-7-Zellen wurden zu dem Zweck rekombinante Fusionsproteine PRG-3-eGFP und PRG-4-eGFP zu gewinnen transfiziert. Es wird hier kurz auf die für die Transfektion von COS-7-Zellen verwendeten Überexpressionsplasmide peGFP-N1-rPRG-3, peGFP-C1-rPRG-3, peGFP-C1-rPRG-4 und peGFP- C1 bzw. peGFP- N1 als Kontrollvektor eingegangen.

Die nachfolgend beschriebenen Arbeitsschritte wurden durch die technischen Mitarbeiter Miriam Petzold und Tobias Thiele und die Masterstudentin Alyssa Thompson durchgeführt.

Die mittels PCR amplifizierte rPRG-3-DNA und rPRG-4-DNA wurde jeweils in die Vektoren peGFP-N1 und peGFP-C1 kloniert. Die Plasmide und die zur Kontrolle dienenden Leervektoren wurden anschließend mittels Hitzeschock in kompetente *E. coli* Bakterien transformiert. Die auf einem Selektivmedium (LB- Medium) kultivierten Klone der *E. coli* Bakterien wurden in DYT-Medium überführt, mit Ampicillin geimpft und über Nacht bei 37°C kultiviert. Anschließend wurde aus den Kulturen die Plasmid-DNA im großen Maßstab mit dem Maxiprep Kit (NucleoBond[®]) nach Vorgaben des Herstellers isoliert. Zur Kontrolle der richtigen Plasmid-DNA wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt und die Größe der DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese bestimmt. Danach wurde photometrisch die DNA-Konzentration (Photometer Pharmacia Biotech UltrospecTM 2000 von GE Healthcare) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Reinheit der DNA wurde durch das Verhältnis bei 260 nm und bei 280 nm bestimmt (Quotient OD260/OD280 für DNA: 1,8). Die Konzentration wurde auf 1µg/µl eingestellt.

3.2.1.2.2 Transfektion

In einer Konzentration von 1x 10^6 Zellen pro Küvette wurden die Zellen mit den fertigen zur Verfügung gestellten Plasmiden peGFP-C1- PRG-3 und peGFP- C1- PRG-4 und dem Leervektor peGFP-C1 mit Hilfe eines Elektroporationsgerätes (Amaxa) und eines Elektroporationskits (Amaxa V Solution) transfiziert. Hierzu wurden die Zellen während der Wachstumsphase bei einer Konfluenz von 80 % in 5 ml Medium abgeschabt. Die Suspension wurde bei 900 x g bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in Amaxa V Solution resuspendiert. 5 μ l Plasmid-DNA wurde hinzugegeben. Der in die Küvetten aliquotierte Transfektionsansatz wurde in das Elektroporationsgerät befördert und die Elektroporation nach dem Protokoll des

Herstellers durchgeführt. Anschließend wurden die Aliquots sofort in frischem Medium suspendiert, auf 9 cm Ø Petrischalen ausplattiert und für 48 Stunden in 5 %iger CO_2 -Atmosphäre, bei 37 °C und bei 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Dann wurden die Zellen nach mikroskopischer Kontrolle der Transfektionseffizienz mit dem Fluoreszenz- Mikroskop IX81 unter dem Filter für die grüne Fluoreszenz bei 550 nm lysiert und die Fusionsproteine mit Hilfe der Proteinisolationsmethoden isoliert (siehe Kapitel 3.2.3.2 und 3.2.3.3).

3.2.2 Generierung von polyklonalen PRG-3- und PRG-4-Peptidantikörpern

Für die Untersuchung des zellulären Expressionsmusters und der ultrastrukturellen Lokalisation von PRG-3 und PRG-4 im sich entwickelnden Gehirn der Ratte wurden Peptidantikörper generiert. Die komplette Herstellung der Peptidantikörper erfolgte durch die Firma BioGenes, Berlin.

Insgesamt 16 Kaninchen wurden nach der Testung von Präimmunseren im Immunblot, durchgeführt von der technischen Mitarbeiterin Miriam Petzold, für die Herstellung der Antikörper ausgewählt. Es wurden nur Präimmunseren verwendet, bei denen im Immunblot keine Immunreaktion mit einem Totalproteinlysat aus Gehirnen von fünf Tage alten Wistarratten detektiert wurde. Die Peptide wurden mit einem *Carrier*, Hemocyanin-Konjugat (aus der Spezies Limulus polyphemus), über dessen SH-Gruppe am Cystein gekoppelt. Die Aminogruppe des *Carriers* wurde mit Maleimid aktiviert. Die Peptide wurden in einem 1000 molaren Überschuss zum Trägerprotein eingesetzt. Das Adjuvant, ein Lipopolysaccharid aus der blaugrünen Alge, wurde zum Stimulieren einer Immunreaktion verwendet [BioGenes]. Jeweils 2 Tiere wurden mit demselben Peptid geimpft. Die Tiere wurden insgesamt dreimal immunisiert:

- 1.Tag: Erstimmunisierung und Blutung (1,5 ml Präimmunserum)
- 7.Tag: 2. Immunisierung
- 14.Tag: 3. Immunisierung

Es wurden nach jeder Immunisierung Probeseren nach 2 Wochen Inkubationszeit entnommen und in Zusammenarbeit mit den technischen Mitarbeitern Miriam Petzold und Tobias Thiele mittels Immunblot mit Totalproteinlysaten aus Gehirnen von fünf Tage alten Wistarratten und mittels DAB-Immunhistochemie 15 und 30 Tage alter Wistarratten untersucht (siehe Kapitel 3.2.4.5 und 3.2.5.2.1).

3.2.3 Proteinbiochemische Methoden

3.2.3.1 Isolierung von Totalproteinlysaten aus Geweben von Wistarratten

Die Arbeitsschritte der Analgesierung der Tiere und Organentnahme sind dem Kapitel 3.2.4.1 zu entnehmen. Die zur Präparation von Totalproteinlysaten verwendeten unfixierten Gewebe männlicher Wistarratten verschiedener Altersstufen wurden nach der Entnahme direkt in Flüssigstickstoff schockgefroren. Das Gewebe wurde anschließend fein zerrieben. Danach wurde es in einem frisch angesetzten Lysispuffer mit Proteaseinhibitoren, mit einer 21 G Kanüle und einer Ultraschallbehandlung (dreimal für je drei Sekunden) aufgeschlossen und homogenisiert und mit einem Vortexgerät geschüttelt. Anschließend wurden die Homogenate bei 3000 x g für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die im Überstand enthaltenen Proteine wurden in Flüssigstickstoff schockgefroren, danach aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

3.2.3.2 Isolierung von zytosolischen, Membran- und Kernproteinfraktionen aus HEK293-Zellen Zu 80 % konfluente HEK293-Zellen und primäre Neurone, die von der technischen Mitarbeiterin Rike Dannenberg aus dem Kortex von embryonalen Rattengehirnen im Embryonalstadium E18 präpariert wurden und für 17 Tage in Kultur gehalten wurden, wurden in der Zellkulturflasche einmal mit sterilem 1x PBS gewaschen, mit dem Zellschaber vom Flaschenboden entfernt, in 10 ml 1 x PBS resuspendiert und für 5 Minuten bei 900 x g zentrifugiert. Der PBS- Puffer wurde dekantiert. Auf das Zellpellet wurde 1ml frisch angesetzter eisgekühlter Lysispuffer gegeben. Die Zellen wurden vorsichtig resuspendiert und auf Eis gestellt. Die Zellmembranen wurden sofort dreimal für drei Sekunden mit Ultraschall aufgeschlossen. Für die zytosolische Proteinfraktion wurde das Zelllysat bei 60.000 x g für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert (Ultrazentrifuge, Rotor TCA 100.4). Der Überstand wurde in Flüssigstickstoff schockgefroren, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt. Das Pellet wurde mit 500 µl Lysispuffer, versetzt mit 1% Triton X-100, resuspendiert, für 30 Minuten auf Eis inkubiert und bei 60.000 x g für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die im Überstand lokalisierten Membranproteine wurden in Flüssigstickstoff schockgefroren, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt. Das Pellet mit der Kernproteinfraktion wurde mit 250 µl Lysispuffer mit 1% Triton X-100 resuspendiert, in Flüssigstickstoff schockgefroren, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

3.2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration der Proteine wurde mit Hilfe des Pierce® BCA Protein Assay Kits (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben bestimmt. Dabei wurde die auf 1:10 - 1:1000 verdünnte Proteinlösung mit dem Reagenz in einer Mikrotiterplatte vermischt und anschließend für 30 min

bei 37°C unter stetigem Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte die photometrische Messung des Lösungsgemisches bei einer Absorption von 562 nm. Das Lösungsgemisch wurde mit Hilfe der BSA Eichreihe verglichen und die Proteinkonzentrationen der Gewebelysate bestimmt.

3.2.3.4 Präparation von rekombinanten Proteinen aus COS-7-Zellen mit dem µMacs Kit

Die mit den Plasmiden peGFP-C1-rPRG-3, peGFP-C1-rPRG-4 und dem Leervektor peGFP- C1 transfizierten COS-7-Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion lysiert. Die rekombinanten Fusionsproteine wurden mit Hilfe der Immunpräzipitationsmethode µMacs Epitope Tagged Protein Isolation Kit über den GFP-Tag nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Zellen wurden zuerst mit Hepespuffer gewaschen. Danach wurden sie mit Lysispuffer homogenisiert und von den Petrischalen abgelöst. Zum Lysat wurden zusätzlich Proteaseinhibitoren (1 Tablette Complete Protease Inhibitor) zugesetzt. Die Zellmembranen wurden mit Ultraschall aufgeschlossen. Nach einer Zentrifugation bei 10.000 g und 4°C für 10 Minuten wurden zum Überstand 50 µl Anti-Tag Micro Beads zugegeben. Das Lysat wurde dann auf eine mit Lysispuffer präparierte Säule in einem Magnetfeld des µMacs Separators gegeben. Nach Inkubation des Lysats mit den Micro Beads und mehrfachen Waschschritten wurde das Eluat mittels Elutionspuffer gewonnen.

3.2.3.5 Präparation von rekombinanten Proteinen mit Hilfe der Immunpräzipitation nach [151] Die im Kapitel 3.2.1.2 beschriebenen transfizierten COS-7-Zellen wurden mit 1x PBS-Puffer gewaschen und auf eine Eisplatte gestellt. 1ml frisch angesetzter Lysispuffer wurde auf jede Platte gegeben und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit einem Zellschaber von den Plattenböden gelöst. Die Zellmembranen wurden dann dreimal eine Sekunde lang mit Ultraschall aufgeschlossen. Die Zelllysate wurden bei 13.000 x g für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Zu den Überständen, in denen die Lysate enthalten waren, wurden 4 μl Antikörper gegeben: 4 μl α GFP (IL-8), 4 μl α PRG-3 und 4 μl α PRG-4. Die Zelllysate wurden über Nacht bei 4°C unter stetiger Bewegung mit den Antikörpern inkubiert. Am nächsten Tag wurde zuerst der Protein-A-Sepharose-Komplex präpariert. Die Stammlösung wurde für ca. eine Minute mit einer Vortexmaschine geschüttelt. Pro Ansatz wurden 40 µl aus der Stammlösung entnommen und zusammen mit 1 µl 100 % BSA verwendet. Die Lösung wurde erneut gut gemischt und für 10 Minuten bei 4°C und 13.000 x g zentrifugiert. Die Protein-A-Sepharosebeads wurden in 25 µl Lysispuffer pro Zelllysatansatz neu gelöst, gut gemischt, zu den Lysaten gegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur unter stetiger Rotation inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen für 10 Minuten bei 13.000 x g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation dekantiert und die Beads neu in 500 μ l Lysispuffer resuspendiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Danach wurden die Beads erneut in 500 μ l Lysispuffer resuspendiert und wieder für 10 Minuten bei 13.000 x g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Die Beads wurden zum Schluss in 25 μ l Probenpuffer resuspendiert und bei –80°C gelagert.

3.2.3.6 SDS- PAGE und Immunblot

3.2.3.6.1 SDS- PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Für die 12 %ige Gelelektrophorese wurden Totalproteinlysate aus Gehirnen von Wistarratten der Entwicklungsstadien E13, E15, E17, E19, E21, P0, P5, P10, P20, P30, P60, die Totalproteinlysate aus verschiedenen Rattenorgangeweben und aus verschiedenen Zelllinien und die rekombinanten Proteine PRG-3-eGFP bzw. PRG-4-eGFP aus transfizierten COS-7-Zellen präpariert (siehe Kapitel 3.2.3.1, 3.2.3.2, 3.2.3.4. und 3.2.3.5).

Es wurde ein 12 %iges Polyacrylamid-Trenngel und ein 3,75 %iges Polyacrylamid-Sammelgel verwendet. Die polymerisierten Gele wurden in eine Elektrophoresekammer, die mit 1 x PBS gefüllt war, gegeben. Die Proteinproben wurden mit 20 mM Trispuffer und 3 x Probenpuffer versetzt. Die Proben und der Marker (siehe Kapitel 3.1.1) wurden bei 95°C für 10 min denaturiert. Durch die Denaturierung der Proteine mit Hilfe des Detergenz SDS und der Erhitzung wurden die Sekundär- und Tertiärstruktur zerstört. Damit sollte erreicht werden, dass die Laufgeschwindigkeit der Proteine im Gel nur noch von ihrer Proteingröße abhängt. Vor und nach der Denaturierung wurden jeweils $1/100}$ der Probenpuffermenge β-Mercaptoethanol dazugegeben, um die Disulfidbrücken zu spalten. Die Probenmengen wurden zwischen 20 µg und 40 µg in 15 µl bis 20 µl gewählt und in gleicher Konzentration und Menge bei einem Gellauf aufgetragen. Alle Gelkammern wurden bestückt, um einen gleichmäßigen Gellauf zu erreichen. Das Einlaufen der Proben und des Markers in das Sammelgel erfolgte bei 80 V bei kleinen und großen Gelläufen. Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht im Trenngel erfolgte bei kleinen Gelläufen bei 120 V für ca. 2 Stunden auf Eis und bei großen Gelläufen zwischen 65 V und 80 V bei 4°C über Nacht.

3.2.3.6.2 Immunblot

Nach der Auftrennung der Proben im Trenngel wurden die Proteine von den Gelen auf Nitrozellulosemembranen (siehe Kapitel 3.1.1) mit Hilfe eines Semi-Dry Elektroblotters elektrophoretisch übertragen. Dabei wurden zunächst die Nitrozellulosemembranen (Protran, BA85, Whatman) und das Blotfilterpapier (Whatman) für einige Minuten im Blotpuffer inkubiert. Die Nitrozellulosemembran wurde auf ein Blotfilterpapier gelegt, darüber das Gel und wieder ein Blotfilterpapier gelegt. Luftblasen und überschüssiger Blotpuffer wurden entfernt. Zwischen Anodenplatte und Kathodenplatte wurden die Proteine bei einer Spannung von 20 V für 45 min aus den Gelen auf die Nitrozellulosemembranen transferiert. Anschließend wurden zur Kontrolle des Proteintransfers die Membranen einige Minuten mit Ponceaurot gefärbt. Die Gele wurden mit Coomassieblau gefärbt, um nicht transferierte Proteine sichtbar zu machen.

3.2.3.7 Detektion der Proteine mit dem PRG-3- bzw. PRG-4-Antikörper

Nach dreimaligem Waschen mit 1 x PBS wurden die Membranen in 10 % Magermilch in 1 x PBS über Nacht bei 4°C inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Am nächsten Tag wurden die Membranen mit den PRG-3- und PRG-4-Antikörpern in verschiedenen Verdünnungen von 1:1000, 1:500 und 1:250 in 1 x PBS über Nacht bei 4°C unter stetiger Bewegung inkubiert und am darauf folgenden Tag dreimal mit 1 x PBS für jeweils 15 min gewaschen. Die Membranen wurden mit dem sekundären monoklonalen Antikörper Anti-Kaninchen (GE Healthcare) in einer Verdünnung von 1:5000 für 2 Stunden bei Raumtemperatur unter stetiger Bewegung inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Membranen erneut dreimal mit 1 x PBS für jeweils 15 min gewaschen. Zum Nachweis der auf den Membranen gebundenen Antikörper wurden die Membranen für 1 Minute mit einer Chemilumineszenz-Mischung (ECLTM) im Verhältnis 1:1 inkubiert. Da der sekundäre Antikörper an eine Peroxidase gekoppelt ist, konnte durch Auflegen und Entwicklung eines Röntgenfilms (siehe Kapitel 3.1.1) zwischen 30 Sekunden und 2 Minuten die entstandene Chemilumineszenz detektiert werden.

3.2.3.8 Prüfung der Spezifität des PRG-3- bzw. PRG-4-Antikörpers

Um die Spezifität der gewählten Antikörper zu verifizieren, wurden die Antikörper mit ihrem Bindungspeptid gesättigt. 2 mg lyophilisierten Peptids (von der Firma BioGenes synthetisiert und zur Verfügung gestellt) wurden zunächst in doppelt destilliertem Wasser unter vorsichtigem Schwenken gelöst. Der pH-Wert wurde mit Hilfe von Indikatorpapier überprüft. Der pH-Wert sollte bei 7 liegen. In einer Verdünnung von 1:1000 für den PRG-3-Antikörper und 1:500 für den PRG-4-Antikörper wurden die Antikörper zu den gelösten Peptiden jeweils in ein Eppendorfgefäß gegeben. Parallel dazu, wurden die Antikörper als Kontrolle in weiteren Eppendorfgefäßen jeweils mit 2 mg BSA inkubiert. In einer dritten Eppendorfgefäßreihe wurden nur die Antikörper gegeben. Die Antikörper wurden für 2 Stunden bei Raumtemperatur unter stetiger Rotation mit den Peptiden und dem BSA inkubiert.

Zuvor wurden mit Totalproteinlysaten aus Gehirnen 5 Tage alter männlicher Wistarratten und den rekombinanten Proteinen PRG-3-eGFP bzw. PRG-4-eGFP beladene Polyacrylamidgele auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Diese Membranen wurden mit diesen Antikörper-Peptid-Ansätzen bzw. Antikörper-BSA-Ansätzen und den Antikörpern ohne vorherige Inkubation mit dem Peptid oder BSA über Nacht bei 4°C unter stetiger Rotation inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Membranen dreimal mit 1 x PBS für 15 Minuten gewaschen und mit dem sekundären monoklonalen Antikörper Anti-Kaninchen (GE Healthcare) in einer Verdünnung von 1:5000 für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membranen wurden erneut dreimal mit 1 x PBS für 15 Minuten gewaschen und mit der im Kapitel 3.2.3.7 erläuterten Chemilumineszenz- Mischung (ECLTM) inkubiert und anschließend mit Röntgenfilmen entwickelt.

3.2.4 Immunhistochemie

3.2.4.1 Anästhesie von Wistarratten

Wistarratten verschiedener postnataler Entwicklungsstadien wurden unter standardisierten Bedingungen gehalten und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Die kombinierte Anästhesie wurde durch die gewichtsadaptierte intraperitoneale Injektion eines Gemisches des dissoziativen Narkotikums Ketamin (25 mg/ml) in Kombination mit den Sedativa Xylazin (1,2 mg/ml) und Acepromazin (0,35 mg/ml) unter Erreichen von Narkose und Schmerzfreiheit erreicht. Embryonale Wistarratten wurden durch den feto-plazentaren Kreislauf über das mit dem Ketamin-Gemisch narkotisierte Muttertier tief analgosediert.

Das Gewebe für die Proteinpräparation wurde danach entnommen und unfixiert in Flüssigstickstoff schockgefroren. Gehirne, die für die immunhistochemischen Färbungen verwendet wurden, wurden nach der Perfusion der Tiere präpariert und fixiert (siehe Kapitel 3.2.4.2 und 3.2.4.3).

3.2.4.2 Perfusion von Wistarratten

Die analgosedierten Tiere zwischen den Entwicklungsstadien P5 bis P30 wurden nach Testung der Schmerzfreiheit auf einem Korkbrett auf dem Rücken liegend fixiert. Die Haut wurde subxiphoidal und beidseits nach lateral entlang des Rippenbogens mit der Präparierschere eröffnet. Die untere Thoraxapertur wurde mit der chirurgischen Pinzette angehoben, sodass das Zwerchfell identifiziert werden konnte. Der Thorax wurde dann mit einer kräftigen Schere beidseits lateral nach kranial bis zur oberen Thoraxapertur inzidiert. Das Zwerchfell wurde mit der Präparierschere beidseits von medial nach lateral eröffnet. Der linke Ventrikel des Herzens wurde mit einer feinen Schere inzidiert. Eine Perfusionsnadel, die an ein Schlauchsystem konnektiert war, wurde im linken Ventrikel platziert und mit einem Klemmchen fixiert. Anschließend wurde das luftleere Schlauchsystem auf einer langsamen Laufrate angeschaltet. Der rechte Vorhof wurde perforiert, sodass sich Blut und Spülflüssigkeit nach außen entleeren konnte. Zunächst wurde mit 0,9 %iger NaCl-Lösung über ein Pumpsystem in Laufraten zwischen 5 ml- 30 ml/min, je nach Gewicht des Tieres, das Tier solange gespült bis sich nur noch klare Spülflüssigkeit aus dem rechten Vorhof entleerte. Zu Beginn wurde noch die abdominale Aorta abgeklemmt, um eine optimale Spülung und Perfusion des cerebralen Kreislaufs zu erwirken. Anschließend wurde das Tier mit einer Lösung aus 4 % Paraformaldehyd und 0,1 % Glutaraldehyd perfundiert bis es spürbar fixiert war. Die Perfusionsvorrichtung wurde entfernt, das Tier dekapitiert und das Gehirn frei präpariert.

Bei Tieren im Entwicklungsstadium P0 wurde die Perfusion unter dem Mikroskop mit einem Blutentnahmesystem (*Butterfly*) und zwei 10 ml Spritzen mit jeweils enthaltenen 0,9 %igen NaCl und 4 % Paraformaldehyd mit 0,1 % Glutaraldehyd nach dem oben beschriebenen Prinzip durchgeführt.

3.2.4.3 Gehirnpräparation

Nach der Dekapitierung der perfundierten Tiere wurde die Haut in der Mittellinie von suboccipital nach parieto-frontal mit der Präparierschere eröffnet. Vom Foramen magnum aus wurde die Schädelkalotte mit der Luer-Zange schrittweise eröffnet und entfernt. Das freiliegende Gehirn wurde mit dem Dissektor vorsichtig mobilisiert und in 4 % Paraformaldehyd aufgenommen.

Embryonale Tiere wurden über einen abdominalen Längsschnitt des Muttertieres und nach Eröffnung des Uterus aus den Amnionhöhlen mit anatomischen Pinzetten frei präpariert und sofort dekapitiert. Die Gehirne wurden unter dem Mikroskop mit dem Mirkodissektor und feinen anatomischen Pinzetten aus dem Schädel präpariert und sofort in 4 % Paraformaldehyd überführt. Die Gehirne wurden über Nacht bei 4°C in 4 % Paraformaldehyd nachfixiert.

3.2.4.4 Vibratomschnitte

In 4 % Paraformaldehyd fixierte Gehirne wurden dreimal mit 0,1 M Phosphatpuffer (PB) gewaschen. Parallel dazu wurde eine 4 %ige Agaroselösung hergestellt. Die Gehirne wurden in die körperwarme Agaroselösung eingebettet. Nachdem die Agarose auspolymerisiert war, wurde ein das Gehirn enthaltender Block ausgeschnitten und mit Hilfe eines Vibratoms (Microm HM 650V) zu 30 bis 50 µm dicke horizontale und sagittale Schnitte verarbeitet. Die Schnitte wurden

sofort in 0,1 M PB in 12 Wellplatten aufgenommen, von Agaroseresten befreit und dann für die immunhistochemischen Färbungen verwendet.

3.2.4.5 Immunhistochemische Färbungen

3.2.4.5.1 DAB-Färbung

Um die Proteinexpression von PRG-3 und PRG-4 in Dauerpräparaten untersuchen zu können, wurde die gut etablierte DAB-Färbemethode, die eine hohe Sensitivität und geringe Hintergrundfärbung zeigt, gewählt. Gleichzeitig wurde mit dieser Methode getestet, welche Permeabilitätsdetergenzien und welche Blockierungslösungen am besten mit den Antikörpern reagieren und das beste Färberesultat lieferten. Diese Färbemethode basiert auf dem Prinzip, dass ein unkonjugierter Primärantikörper an sein Epitop im Gewebe bindet und ein biotinylierter Sekundärantikörper an den Primärantikörper bindet. An den Sekundärantikörper ist Biotin gekoppelt, das nachfolgend durch seine hohe Affinität zu Avidin einen Avidin-Peroxidase-Komplex bildet, der wiederum nach Zugabe von Wasserstoffperoxid über frei werdende Protonen Diaminobenzidin (DAB) oxidieren kann, das dann als brauner Farbstoff unter normalem Licht zu detektieren ist. Durch die Zugabe von Metallionen kann die Färbung intensiviert werden.

Die frisch präparierten Schnitte wurden zweimal mit Waschpuffer für 15 Minuten gewaschen. Anschließend wurden sie in 50 mM Ammoniumchlorid-Lösung für 15 Minuten gequencht, um die Hintergrundfärbung zu minimieren. Nach viermaligem Waschen mit Waschpuffer wurden die Schnitte für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Lichtschutz in 0,1 %iger Wasserstoffperoxidlösung inkubiert, um unspezifische endogene Peroxidasen zu sättigen. Die Schnitte wurden wieder mit Waschpuffer gewaschen bis keine Luftblasen mehr zu sehen waren. Nach darauf folgender Blockierung der Schnitte mit einer Blockierungslösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur wurden die Schnitte mit den PRG-3- und PRG-4-Antikörpern in einer Konzentration von 1:1000 für den PRG-3-Antikörper und 1:500 für den PRG-4-Antikörper in der Blockierungslösung über Nacht bei 4°C unter stetiger Bewegung inkubiert.

Bei den verschiedenen verwendeten Blockierungslösungen eigneten sich für beide Antikörper bei postnatalen Geweben sowohl 0,1 % Saponin, 0,1 % Triton X- 100 als auch das Schockgefrieren in Flüssigstickstoff und anschließender Blockierung mit 10 % FCS oder 10 % NGS. Bei embryonalem Gewebe wurde auf ein Detergenz verzichtet. Die Blockierungslösungen bestanden nur aus 10 % FCS bzw. 10 % NGS in 0,1 M PB ohne Thimerosal.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte viermal mit Waschpuffer für 15 Minuten gewaschen und mit dem biotinylierten sekundären Antikörper Anti-Kaninchen in der Blockierungslösung in einer Konzentration von 1:500 über Nacht inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Schnitte erneut viermal mit Waschpuffer für 15 Minuten gewaschen. Während dieser Zeit wurde der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC- Komplex) in 0,1 M PB angesetzt. Dabei wurden pro 1 ml Phosphatpuffer jeweils 15 µl des Reagenz A und B (ABC-Elite Kit) unter Lichtschutz vermischt und für 30 Minuten unter stetigem Schütteln inkubiert. Die Schnitte wurden mit dieser ABC-Lösung für 2 Stunden bei Raumtemperatur bei stetiger Bewegung im Dunkeln inkubiert. Der überschüssige ABC-Komplex wurde nach der zweistündigen Inkubation dreimal mit Waschpuffer für 15 Minuten ausgewaschen. Zur Sichtbarmachung der Färbung wurden 700 µl 1 % iges DAB in 0,1 M PB frisch angesetzt. Die DAB-Lösung wurde zuerst mit Filterpapier filtriert, um ein Ausfällen zu vermindern. Gleichzeitig wurde eine 0,3 %ige H₂O₂-Lösung in 0,1 M Phosphatpuffer unter Lichtschutz frisch angesetzt. Zu 10 ml DAB-Lösung wurde unmittelbar vor Gebrauch eine 240 µl 1 %ige Cobaltchloridlösung und 200 µl 1 %ige Ammoniumnickelsulfatlösung gegeben und je ein Milliliter in ein Well bzw. auf einen Schnitt gegeben. Um die Farbreaktion zu starten wurde dann zu 1 ml DAB-Lösung 1 µl 0,3 %ige H₂O₂-Lösung zugesetzt und die Schnitte dann mit der DAB-Lösung für maximal 10 Minuten unter stetiger Bewegung und lichtmikroskopischer Kontrolle inkubiert. Zum Stoppen der Farbreaktion wurden die Schnitte zweimal für fünf Minuten und danach dreimal für 10 Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte auf gelatinierte Objektträger aufgezogen, auf denen sie über Nacht trockneten. In der aufsteigenden Alkoholreihe von 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 % und 100 % für jeweils zwei Minuten bis zum Xylol wurden die Schnitte dann entwässert. Die entwässerten Schnitte wurden mit Entellan (siehe Kapitel 3.1.1) eingedeckt und über Nacht zum Aushärten an der Luft getrocknet.

Die Gewebeschnitte, die als Negativkontrollen fungierten, wurden analog behandelt. Es wurde allerdings jeweils in den Blockierungslösungen auf den primären Antikörper verzichtet, sodass diese Schnitte nur mit der Blockierungslösung inkubiert wurde. Die Schnitte wurden im nächsten Schritt mit dem Sekundärantikörper inkubiert und dann mit dem ABC-Reagenz und dem DAB entwickelt.

Marker	Lokalisation in IHC
MAP-1 : Mikrotubuli-assoziiertes Protein 1: Hauptbestandteil der Mikrotubuli-Seitenarme im Axon	im Perikaryon, in den Axonen und Dendriten
MAP-2 : Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2: neuronenspezifisches zytoskelettales Protein	im Perikaryon und in den Dendriten, nicht in Axonen
Synaptophysin : synaptisches vesikuläres Membranprotein, ubiquitär auf synaptischen Vesikeln	in Neuronen und neuroendokrinen Zellen, die an der synaptischen Transmission beteiligt sind
Tau-1 : Mikrotubuli- assoziiertes Protein, das die axonalen Mikrotubuli stabilisiert	in Axonen, nicht in Dendriten oder im Perikaryon
Neurofilament : Intermediärfilament zwischen Mikrofilamenten und Mikrotubuli als Komponente des Zytoskeletts, Neurofilament 200 kDa: schwere Untereinheit	vornehmlich in Axonen
VGlut-1 : Vesikulärer Glutamat Transporter 1:	in glutamtergen präsynaptischen Synapsen dominanter Transporter im Kortex, Hippocampus und Cerebellum
VGlut-2: Vesikulärer Glutamat Transporter 2:	in glutamtergen präsynaptischen Synapsen in thalamischen und hypothalamischen Regionen, Hirnstamm und in den tiefen cerebellären Nuclei
VGat: vesikulärer GABA Transporter	in präsynaptischen GABAergen Synapsen
NeuN : DNA-bindendes, neuronenspezifisches Protein	in Nuclei postmitotischer Neurone, Perikarya, einige proximale Dendriten und Axone, nicht in z.B. Purkinjezellen, Neuronen der cerebellären Nuclei, retinalen Zellen, Cajal- Retzius-Zellen
Parvalbumin: Calcium-bindendes Protein	vornehmlich in GABAergen Interneuronen im Kortex, Cerebellum, Hippocampus, Purkinjezellen und Muskelzellen
Calbindin: Calcium-bindendes Protein	vornehmlich in Körnerzellen des Gyrus dentatus, Purkinjezellen des Cerebellums, meist GABAergen Interneuronen
Calretinin: Calcium-bindendes Protein	in Interneuronen, sensorischen Projektionsneurone
GFAP : Saures Gliafaserprotein: Hauptbestandteil der Intermediärfilamente vorwiegend in Astrozyten	in Astrozyten, radialen Gliazellen
IB4: Isolectin B4	in Mikroglia, und auch Endothelzellen
CNPase: zyklische Nukleotid-	in allen Reifestadien von Oligodendrozyten,
Phosphodiesterase	Schwannzellen, Myelinfasern
der Zellmembran von Oligodendrozyten, wird erst postnatal exprimiert	in unreifen Oligodendrozyten
NG2: in die Zellmembran integriertes	in Progenitor-Oligodendrozyten und
Chondroitinsultat-Proteoglykan	astrozytären Vorläuferzellen

3.2.4.5.2 Identifizierung von PRG-3 und PRG-4 mittels Doppelimmunfluoreszenz

Nestin: Intermediärfilament Typ VI,	in neuronalen Progenitorzellen in der SVZ
involviert in Axonwachstum, hochreguliert	
während der Embryonalentwicklung	
GAP43: Wachstum- assoziiertes Protein,	in axonalen Wachstumskegeln
hochreguliert in axonalen Wachstumskegeln	
während der Entwicklung und nach	
Schädigung	
PSA- Ncam: Polysialinsäure-neurales	in migrierenden neuronalen Progenitorzellen,
Zelladhäsionsmolekül, PSA ist ein,	vornehmlich in der SVZ und Gyrus dentatus
Kohlenhydratpolymer, Ncam ist ein	
Glykoprotein der Immunglobulin-artigen	
Zelladhäsionmoleküle, stark während der	
Embryonalentwicklung exprimiert	

Tabelle 3.1: Die verwendeten Markerproteine und ihre Lokalisation sind tabellarisch aufgeführt.

Zur Untersuchung der gewebespezifischen und intrazellulären Lokalisation von PRG-3 und PRG-4 wurden Doppelimmunfluoreszenzstudien durchgeführt. Bei dieser Methode ist der sekundäre Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, der nach Anregung seiner spezifischen Wellenlänge Licht einer höheren Wellenlänge emittieren kann.

Wistarratten der Entwicklungsstadien P0, P5, P10 und P15 wurden, wie im Kapitel 3.2.4.2 beschrieben, perfundiert. Die Gehirne wurden, wie in den Kapiteln 3.2.4.3 und 3.2.4.4 beschrieben, präpariert.

Für Doppelimmunfluoreszenz-Färbungen wurden die in Tabelle 3.1 aufgelisteten Marker eingesetzt. Die Schnitte wurden wie im Kapitel 3.2.4.5.1 behandelt. Jedoch wurden keine endogenen Peroxidasen mit Wasserstoffperoxid inaktiviert. Die Gewebeschnitte wurden mit den Markern Anti-MAP1, Anti-MAP2, Anti-CNPase, Anti-O4, Anti-NG2, Anti-GFAP, Anti-NeuN, Anti-Parvalbumin, Anti-Synaptophysin, Anti-Tau1, Anti-GAP43, Anti-Neurofilament, Anti-Flotillin, Anti-Nestin, Anti-VGlut1, Anti-VGlut2, Anti-VGat, Anti-IB4-FITC und Anti-PSA-Ncam jeweils simultan mit dem PRG-3- bzw. PRG-4-Antikörper in 0,1 % Saponin und 10 % FCS in 0,1 M PB über Nacht bei 4°C mit den in der Tabelle 2.1 angegebenen Verdünnungen inkubiert. Für die Doppelimmunfluoreszenz-Untersuchungen mit Anti-PSA-Ncam wurden die Schnitte vor der Inbukation mit den primären Antikörpern für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 100 % Methanol versetzt mit 0,3 % H_2O_2 inkubiert und anschließend viermal mit Waschpuffer gewaschen. Am nächsten Tag wurde viermal mit dem Waschpuffer für 15 Minuten gewaschen und anschließend mit den sekundären Antikörpern Alexa 488 Anti-Kaninchen und Alexa 568 Anti-Maus in der Blockierungslösung bei Raumtemperatur unter Lichtschutz inkubiert. Nach zweistündiger Inkubationszeit wurden die Schnitte erneut viermal mit dem Waschpuffer für 15 Minuten gewaschen. Der primäre Antikörper Anti-IB4-FITC ist direkt mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Bei diesen Doppelfärbungen wurde demzufolge ein roter sekundärer Antikörper Alexa 568 Anti-Kaninchen zur Detektion des PRG-3- bzw. PRG-4-Antikörpers verwendet.

Für die Doppelimmunfluoreszenz-Untersuchungen mit den Markern Anti-Calbindin und Anti-Calretinin wurden die Gewebeschnitte jeweils mit 0,02 M PB gewaschen und mit der Blockierungslösung 0,1 % Triton X-100 und 1 % BSA in 0,02 M PB über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde zweimal mit der Blockierungslösung und danach einmal mit 0,02 M PB für jeweils 15 Minuten gewaschen. Die Inkubation mit den sekundären Antikörpern Alexa 488 Anti-Kaninchen und Alexa 568 Anti-Maus erfolgte in 0,02 M PB für zwei Stunden bei Raumtemperatur unter Lichtschutz. Anschließend wurde dreimal mit der Blockierungslösung für jeweils zehn Minuten gewaschen.

Alle Gewebeschnitte wurden anschließend für 5 Minuten mit der Hoechstlösung zur Darstellung der Zellkerne in einer Endkonzentration von 1:10.000 inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit den jeweiligen Pufferlösungen wurden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen, kurz luftgetrocknet und mit Immu-Mount (siehe Kapitel 3.1.1) eingedeckt. Zum Aushärten wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

Die Gewebeschnitte, die als Negativkontrollen fungierten, wurden analog zum Kapitel 3.2.4.5.1 behandelt. Es wurde jeweils in den Blockierungslösungen auf den primären Antikörper verzichtet, sodass diese Schnitte nur mit der Blockierungslösung inkubiert wurden. Die Schnitte wurden im nächsten Schritt mit dem Sekundärantikörper inkubiert und anschließend mit Hoechst als Kernfärbung inkubiert.

3.2.4.5.3 Doppelimmunfluoreszenz auf embryonalem Gehirngewebe

Die Gewebeschnitte wurden in 1 x PBS 24 Wellplatten aufgenommen, zweimal für jeweils zwei Minuten mit PBST und nachfolgend dreimal für zwei Minuten mit 1 x PBS mit 10 % HS gewaschen und in dieser Lösung für zwei Stunden bei Raumtemperatur geblockt und permeabilisiert. Die Marker Anti-Nestin und Anti-GAP43 wurden in 1 x PBS mit 10 % HS jeweils simultan mit dem PRG-3- bzw. PRG-4-Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Als nächstes wurde dreimal für fünf Minuten mit 1x PBS gewaschen. Dann wurde einmalig für sechs Minuten mit 1 x PBS mit 10 % HS gewaschen. Die Inkubation mit den sekundären Antikörpern Alexa 488 Anti-Kaninchen und Alexa 568 Anti-Maus erfolgte in 1 x PBS mit 10 % HS für eine halbe Stunde. Anschließend erfolgte die Kernfärbung mit Hoechst. Die Schnitte wurden in absteigender Konzentration mit 1 x PBS mit 10 % HS, 1 x PBS mit 3 % HS, 1 x PBS und einmal für zehn Minuten mit 10 mM Trispuffer, pH 8,0 gewaschen, auf Objektträger aufgezogen und mit Immu-Mount eingedeckt.

3.2.5 Elektronenmikroskopie

Zunächst wurde eine DAB-Immunhistochemie von Gewebeschnitten 15 Tage alter Wistarratten, wie im Kapitel 3.2.4.5.1 beschrieben, durchgeführt. Das Gewebe wurde allerdings nur durch Schockgefrieren in Flüssigstickstoff permeabilisiert. Aus diesen frei flottierenden Schnitten wurden die gewünschten Regionen mit einem Skalpell ausgeschnitten.

Die folgenden Arbeitsschritte wurden in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Thomas Naumann (Charité) durchgeführt. Zwei bis drei Ausschnitte wurden jeweils in ein sauberes Gläschen überführt, der Phosphatpuffer wurde abpipettiert und 4 %iges Osmium auf die Schnitte gegeben bis sie bedeckt waren. Dieser Vorgang fand lichtgeschützt statt, weil das Osmium lichtempfindlich ist. Das Osmium wirkte bei gelegentlichen Schwenken der Gläschen für ca. 20 Minuten ein bis unter mikroskopischer Kontrolle sich eine deutlich braune Färbung einstellte. Dann wurden die Schnitte dreimal initial hintereinander, danach einmal nach 10 Minuten mit 0.1 M Phosphatpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe für jeweils 10 Minuten in unvergelltem 30 %igen, 50 %igen, 75 %igen Ethanol mit 0,5 % Uranylacetat und 0,5 % Phosphorwolframsäure für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln und dann in 96 %igen und 100 %igen Ethanol jeweils für 10 Minuten. Die Schnitte wurden in frische Gläschen überführt und zweimal mit 100 %igen Ethanol mit Cu II-Sulfat und zweimal mit Propylenoxid jeweils für 10 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation in einer aufsteigenden Harzkonzentration: im 1:3 und 1:1 Verhältnis Harz (Epon): Propylenoxid für jeweils 30 Minuten, im 3:1 Verhältnis über Nacht bei 4°C und zweimal in 100 % Harz für jeweils 30 Minuten. In dieser Zeit wurden die Objektträger in Trennmittel getaucht und getrocknet. Die Schnitte wurden danach auf den getrockneten Objektträgern platziert, mit Harz (Epon) bedeckt, mit Deckgläschen abgedeckt und bei 65°C über Nacht ausgehärtet. Die gewünschten Regionen wurden mit einem Olympus Mikroskop BX 51 und der NTAS[®] Kamera fotografiert, um eine Orientierung beim anschließenden Trimmen zu bekommen. Nach dem Trimmen der gewünschten Regionen und Anfertigen von Semidünnschnitten wurden mit einem Ultramikrotom 70 nm dicke Schnitte angefertigt und auf sogenannte Grits geklebt. Diese Arbeitsschritte wurden in Zusammenarbeit mit der technischen Mitarbeiterin Frau Steuer durchgeführt.

3.2.6 Mikroskopische Auswertung

Die DAB-immunhistologischen Schnitte wurden mit einem Olympus Mikroskop BX 51 mit den Objektiven 4x, 10x, 20x, 40x, 60x und 100x ausgewertet, mit der Kamera Olympus IX-70 dokumentiert und als JPEC- und TIFF-Dateien gespeichert.

Die Immunfluoreszenz-Schnitte wurden mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop von Leica mit dem Argon-Ionen-Laser bei einer Wellenlänge von 405 nm und dem Helium-Neon-Laser bei einer Wellenlänge von 543 nm aufgenommen und dokumentiert. Es wurden die durch Überlagerung der Farbkanäle der konfokalen Aufnahmen entstandenen Kolokalisationen in Form von sog. *"Z-stacks"* aufgenommen. Etwaige unspezifische Hintergrundfärbungen wurden durch die Software des Konfokalmikroskops und mit Hilfe von Adobe Photoshop bearbeitet.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden mit einem Elektronenmikroskop Zeiss EM 900 in Zusammenarbeit mit der technischen Mitarbeiterin Frau Steuer angefertigt. Dokumentiert wurden die Aufnahmen mit Hilfe der Zeiss Axioplan Kamera.

4. Ergebnisse

4.1 Generierung von polyklonalen PRG-3- und PRG-4-Peptidantikörpern

Die PRG-3-mRNA-Expression in verschiedenen Geweben wurde bereits von Savaskan *et al.* 2004 im Northernblot beschrieben. Dabei ergab sich die stärkste Expression der mRNA im Gehirn und in geringen Mengen auch in der Leber, Niere und im Hoden [144]. Die Arbeitsgruppe um Andrew J. Morris veröffentlichte Ergebnisse, die eine starke Expression des PRG-3-Proteins in der Leber, im Gehirn, in der Niere, Milz und im Herzen zeigt [145]. Darüber hinaus zeigte Tanja Velmans in ihrer Dissertation, dass in der Spezies Maus die mRNA von PRG-3 im Gehirn, Hoden, in der Niere und Leber exprimiert wird, jedoch das PRG-3-Protein im Immunblot ausschließlich in Proteinlysaten aus Gehirngewebe nachweisbar ist [152]. Für die Expression der mRNA von PRG-4 existieren bisher noch keine veröffentlichten Daten. Eine systematische Analyse beider Proteine im sich entwickelnden Gehirn der Ratte *in vivo* erfolgte bisher noch nicht.

Um das zelluläre und subzelluläre Verteilungsmuster beider Moleküle im sich entwickelnden Gehirn der Ratte auf Proteinebene genauer untersuchen zu können, wurde in dieser Arbeit jeweils für PRG-3 und PRG-4 ein nicht kommerziell erhältlicher Antikörper gewählt, den die Firma BioGenes aus Kaninchen generierte. Die detaillierte Durchführung ist dem Kapitel 3.2.2 im Methodenteil zu entnehmen. Dieser Antikörper sollte spezifisch eine saubere Bande im Immunblot erkennen und gleichzeitig eine spezifische und hintergrundarme Färbung in der Immunhistochemie reproduzieren. Die Peptidregionen wurden so gewählt, dass sie einzigartig für das jeweilige Protein sind, so dass unspezifische Bindungen des Antikörpers an Peptide anderer, z.B. PRG-3 und PRG-4 nahe verwandter Proteine, vermieden werden.

Zunächst wurden aus einer Anzahl von Kaninchen nur die Tiere ausgewählt, deren Präimmunseren keine Kreuzreaktivitäten vor der Immunisierung mit den jeweiligen Peptiden im Immunblot vorwiesen. Insgesamt wurden 16 PRG-3- und 16 PRG-4-Präimmunseren ausgewählt. Nach jeder Immunisierung der Tiere wurde das Serum mittels Immunblot und Immunhistochemie untersucht (siehe Tabelle 4.1 und 4.2).

	Peptid: rPRG-3 280-293					
Tier		1. Immunisierung	2a. Immunisierung	2b. Immunisierung	3. Immunisierung	
62	WB	Bande bei ca. 45 kDa und schwache Bande bei 32,5 kDa, erkennt re PRG-3	Bande bei ca. 47,5 kDa, erkennt re PRG-3, wenig Hintergrund	schwache Bande bei 45 kDa, starker Hintergrund, erkennt schwach re PRG-3	erkennt schwach re PRG-3, starker Hintergrund	
	IHC	starke Färbung von Neuronen, Hintergrund relativ stark	starke Färbung von Neuronen, wenig Hintergrund	schwache Färbung von Neuronen, Hintergrund relativ stark	schwache Färbung von Neuronen, starker Hintergrund	
64	WB	Eine Bande bei 25 kDa	schwache Bande bei 25 kDa	/	Bande bei 60 kDa und 30 kDa, sehr wenig Hintergrund	
	IHC	schwache Färbung von Neuronen, wenig Hintergrund	/	/	schwache Färbung von Neuronen, wenig Hintergrund	

Peptid: rPRG-3 296-310					
Tier		1. Immunisierung	2a. Immunisierung	2b. Immunisierung	3. Immunisierung
65	WB	Doppelbande bei ca. 42 kDa, erkennt re PRG-3	kein Signal	/	Multiple Banden bei 47,5 kDa und 25 kDa
	IHC	schwache Färbung von Neuronen	/	/	schwache Färbung von Neuronen
66	WB	Doppelbande bei ca. 42 kDa, erkennt re PRG-3	eine Bande bei ca. 42 kDa, erkennt re PRG-3	Bande bei 62 kDa und 47,5 kDa, starker Hintergrund	kein Signal
	IHC	starke Färbung von Neuronen, starker Hintergrund	/	starke Färbung von Neuronen, starker Hintergrund	Färbung von Neuronen, starker Hintergrund

Peptid: rPRG-3 186-199						
Tier		1. Immunisierung	2a. Immunisierung	2b. Immunisierung	3. Immunisierung	
68	WB	kein Signal, nur Hintergrund	kein Signal	/	kein Signal	
	IHC	Schwache Färbung von Gliazellen und Neuronen, Myelin	/	/	Schwache Färbung von Gliazellen und Myelin und Hintergrund	
70	WB	Eine Bande bei ca. 30 kDa, erkennt re PRG-3	eine Bande bei ca. 42 kDa, erkennt re PRG-3	erkennt schwach re PRG-3, nicht endogenes PRG-3	Bande bei ca. 50 kDa	
	IHC	Färbung von Gliazellen und Neuronen, starker Hintergrund	/	Färbung von Gliazellen und Neuronen, starker Hintergrund	Färbung von Gliazellen und Neuronen, starker Hintergrund	

Peptid: rPRG-3 53-66						
Tier		1. Immunisierung	2a. Immunisierung	2b. Immunisierung	3. Immunisierung	
71	WB	multiple Banden über und unter 47,5 kDa	eine Bande bei ca. 42 kDa, erkennt re PRG-3	Doppelbande bei 47,5 kDa, erkennt re PRG-3	schwache Bande bei 47,5 kDa	
	IHC	Färbung von Gliazellen und Neuronen, starker Hintergrund	/	Färbung von Gliazellen und Neuronen, starker Hintergrund	Färbung von Gliazellen und Neuronen, starker Hintergrund	
78	WB	eine Bande bei ca. 42 kDa	kein Signal	/	kein Signal	
	IHC	Färbung von Gliazellen und Neuronen, starker Hintergrund	/	/	Färbung von Gliazellen und Neuronen, starker Hintergrund	

Tabelle 4.1: Tabellarische Zusammenfassung der für die Immunisierungen verwendeten Peptide für PRG-3 (siehe Peptidsequenzen) und der Ergebnisse im Immunblot und in der Immunhistochemie der jeweiligen Antiseren nach insgesamt drei Immunisierungen von jeweils zwei Tieren (siehe Tiernummerierung). WB Westernblot (Immunblot), IHC Immunhistochemie

Peptid: rPRG-4 323-337						
Tier		1. Immunisierung	2a. Immunisierung	2b. Immunisierung	3. Immunisierung	
80	WB	Bande bei ca. 42 kDa und Negativbande bei ca. 36 kDa	schwache Bande bei ca. 36 kDa	/	Bande bei 60 kDa und 25 kDa	
	IHC	Färbung von Neuronen, Dendriten, viel Hintergrund	/	/	schwache Färbung von Neuronen	
83	WB	Negativbanden bei ca. 42 kDa und 36 kDa	schwache Bande bei ca. 36 kDa	/	schwache Bande bei 60 kDa	
	IHC	Färbung von Neuronen, Dendriten, viel Hintergrund	/	/	schwache Färbung von Neuronen, Dendriten	

Peptid: rPRG-4 305-319						
Tier		1. Immunisierung	2a. Immunisierung	2b. Immunisierung	3. Immunisierung	
4	WB	Bande bei ca. 36 kDa und Negativbande bei ca. 42 kDa	Bande bei ca. 40 kDa, erkennt re PRG-4	/	Bande bei ca. 38 kDa	
	IHC	Färbung von Neuronen, Dendriten	schwache Färbung von Neuronen, Dendriten	/	starke Färbung von Neuronen, Dendriten, leichter Hintergrund	
5	WB	Negativbanden bei ca. 45 kDa und 36 kDa	kein Signal	/	Bande bei 60 kDa	
	IHC	Färbung von Neuronen, Dendriten	/	/	schwache Färbung von Neuronen, Dendriten	

Peptid: rPRG-4 157-171							
Tier		1. Immunisierung	2a. Immunisierung	2b. Immunisierung	3. Immunisierung		
7	WB	schwache Negativbanden bei ca. 45 bis 40 kDa	Bande bei ca. 47,5 kDa	multiple Banden bei ca. 70 kDa, 45 kDa und 32,5 kDa	Doppelbande bei ca. 65 kDa		
	IHC	starke Färbung von Neuronen, Dendriten, starker Hintergrund	/	Färbung von Neuronen, Dendriten, starker Hintergrund	Färbung von Neuronen, Dendriten, starker Hintergrund		
40	WB	Negativbande bei ca. 36 kDa	kein Signal	/	kein Signal		
	IHC	Färbung von Neuronen, Dendriten	/	/	/		

Peptid: rPRG-4 51-68							
Tier		1. Immunisierung	2a. Immunisierung	2b. Immunisierung	3. Immunisierung		
50	WB	Bande bei ca. 83 kDa und 50 kDa, schwache Bande bei ca. 36 kDa	starke Bande bei ca. 36 kDa	Bande bei ca. 47,5 kDa	multiple Banden bei ca. 85 kDa, 65 kDa und 60 kDa		
	IHC	Färbung von Neuronen, Dendriten, starker Hintergrund	/	Färbung von Neuronen, Dendriten, starker Hintergrund	/		
52	WB	Bande bei ca. 60 kDa und schwache Bande bei ca. 36 kDa	Bande bei ca. 36 kDa	Bande bei ca. 40 kDa	Bande bei ca. 62 kDa und 38 kDa		
	IHC	Färbung von Neuronen, Dendriten, starker Hintergrund	/	Färbung von Neuronen, Dendriten, starker Hintergrund	/		

Tabelle 4.2: Zusammengefasst werden die Peptide für PRG-4 (siehe Peptidsequenzen), die für die Immunisierung der Kaninchen verwendet wurden. Die Ergebnisse im Immunblot und in der Immunhistochemie der jeweiligen Antiseren nach insgesamt drei Immunisierungen von jeweils zwei Tieren (siehe Tiernummerierung) werden erfasst. WB Westernblot (Immunblot), IHC Immunhistochemie Für diese Arbeit wurde für PRG-3 das Antiserum 280-293: C-KGTQGSASKPKPED des Tieres 62 nach der zweiten Immunisierung gewählt, da es die beste Kombination der Testergebnisse im Immunblot und in der Immunhistochemie aufwies. Dieser Antikörper erkennt ein Epitop, das im intrazellulär gelegenen C-Terminus des Proteins lokalisiert ist. Diese Peptidsequenz wurde in der Abbildung 4.1 rot markiert. Im Immunblot zeigte sich eine reproduzierbare saubere Bande in Totalproteinlysaten aus Rattengehirnen. Der Antikörper erkannte das Fusionsprotein PRG-3-eGFP. In der Immunhistochemie ergab sich ein spezifisches und hintergrundarmes Färbemuster.



Abbildung 4.1: Proteinstruktur von PRG-3 als Kugelmodell in der Zellmembran in der Spezies Rattus norwegicus (NCBI-Nummer AY299399). Rot unterlegt ist die Peptidregion, gegen die der PRG-3-Antikörper gerichtet ist. Die Region befindet sich im intrazellulär gelegenen C-Terminus des Proteins.

Die Antiseren, die jeweils nach den Immunisierungen des Tieres 62 entnommen wurden, werden in der Abbildung 4.2 gegenüber gestellt. Das Präimmunserum vor der ersten Immunisierung ergab kein Immunprodukt in Totalproteinlysaten aus Rattengehirnen. Nach der ersten Immunisierung erkannte das Antiserum mehrere Banden in den Höhen von 47,5 kDa und 32,5 kDa. Das Fusionsprotein PRG-3-eGFP wurde bei 62 kDa schwach detektiert. Die Probeblutung der zweiten Immunisierung zeigte eine deutliche saubere Bande in Höhe von 47,5 kDa in der Spur des Totalproteinextraktes und eine Bande in der Spur des Fusionsprotein PRG-3-eGFP in Höhe von 62 kDa (Abbildung 4.2 A, grüne und schwarze Pfeile). Das Antiserum nach der zweiten Immunisierung erkannte im Totalproteinextrakt kein Proteinprodukt, aber das Fusionsprotein. Nach der dritten Immunisierung detektierte das Antiserum sehr schwach das Fusionsprotein und wies einen deutlichen Hintergrund auf. Die Banden in Höhe von ca. 25 kDa in der Fusionsproteinspur aller Immunblots können eine Reaktion des Antikörpers mit degradierten Proteinfragmenten sein (Abbildung 4.2 A, untere schwarze Pfeile).

Ergebnisse 51



Abbildung 4.2: Immunseren des Tieres 62, das mit dem Peptid 280-293: C-KGTQGSASKPKPED immunisiert wurde. A repräsentiert das endogene PRG-3 im Totalproteinlysat aus Rattengehirnen, P5 (grüne Pfeile) und das mit dem µMacs Kit aufgereinigte Fusionsprotein PRG-3-eGFP aus COS-7-Zellen (schwarze Pfeile), nachgewiesen mit den Antiseren der drei Immunisierungen. B zeigt ß-Actin (schwarze Pfeile) als Ladungskontrolle, nachgewiesen mit dem monoklonalen Antikörper gegen ß-Actin. C stellt das Fusionsprotein PRG-3-eGFP (schwarze Pfeile) dar, nachgewiesen mit dem monoklonalen Antikörper JL-8. Molekulargewicht in kDa (Prestained Protein Marker, New England Biolabs)

Als Ladungskontrolle wurde β-Actin verwendet (Abbildung 4.2 B, schwarze Pfeile). Die Integrität des Fusionsproteins wurde mit Hilfe des monoklonalen eGFP-Antikörpers (JI-8) in Höhe von 62 kDa nachgewiesen (Abbildung 4.2 C). Die Banden in Höhe von ca. 28 kDa und 16,5 kDa können eGFP-Proteinfragmente sein (Abbildung 4.2 C, untere schwarze Pfeile).



Abbildung 4.3: Proteinstruktur von PRG-4 als Kugelmodell in der Zellmembran in der Spezies Rattus norwegicus (NCBI-Nummer AY310911). Rot unterlegt ist die Peptidregion, gegen die der PRG-4-Antikörper gerichtet ist. Die Region befindet sich im intrazellulär gelegenen C-Terminus des Proteins.

Für PRG-4 wurde das Antiserum 323-337: C-RIRHRHGSPHPSRRT des Tieres 4 im ebenfalls intrazellulär gelegenen C-Terminus des Proteins gewählt (Abbildung 4.3).

Mit Hilfe der Immunblots der Antiseren vor und nach drei Immunisierungen konnte analog zu PRG-3 nachgewiesen werden, dass das Präimmunserum keine Kreuzreaktivität in Totalproteinlysaten aus Rattengehirnen aufwies. Nach allen drei Immunisierungen konnte mit den Antiseren eine deutliche Bande in den Totalproteinlysaten in Höhe von 40 kDa und eine bei 62 kDa in der Spur des Fusionsproteins PRG-4-eGFP detektiert werden. Nach der zweiten Immunisierung erkannte das Antiserum eine zusätzliche Bande unterhalb von 32,5 kDa. Im Vergleich dazu ergab sich ein geringerer Hintergrund als bei den beiden anderen Immunisierungen (Abbildung 4.4 A). Als Ladungskontrolle wurde β-Actin verwendet und mit dem monoklonalen Antikörper gegen β-Actin nachgewiesen (Abbildung 3.4 B, schwarze Pfeile). Das Fusionsprotein PRG-4-eGFP wurde in den Immunblots mit dem monoklonalen Antikörper gerichtet gegen eGFP nachgewiesen (Abbildung 4.4 C, schwarze Pfeile). Als definitiver Antikörper wurde das Antiserum nach der dritten Immunisierung verwendet, das ein sauberes Immunprodukt im Immunblot detektierte und eine spezifische saubere Färbung in der Immunhistochemie wiedergab.



Abbildung 4.4: Immunseren des Tieres 4, das mit dem Peptid 323-337: C-RIRHRHGSPHPSRRT immunisiert wurde. A zeigt das endogene PRG-4 (grüne Pfeile) im Totalproteinlysat aus Rattengehirnen, P5 und das Fusionsprotein PRG-4-eGFP (schwarze Pfeile), isoliert aus COS-7-Zellen mittels dem µMacs Kit, nachgewiesen mit den Antiseren der drei Immunisierungen. B zeigt ß-Actin (Pfeilspitze) als Ladungskontrolle, nachgewiesen mit dem monoklonalen Antikörper ß-Actin. C stellt das Fusionsprotein PRG-4-eGFP (schwarze Pfeile) dar, nachgewiesen mit dem monoklonalen Antikörper JL-8. Molekulargewicht in kDa (Prestained Protein Marker, New England Biolabs)

4.2 Verifizierung der Spezifität der Antikörper

Um die Spezifität der nicht affinitätsaufgereinigten PRG-3- und PRG-4-Antikörper zu überprüfen, wurden die Antikörper in einem weiteren Versuch vor der Inkubation mit den Immunblots mit dem jeweiligen Bindungspeptid, gegen das der jeweilige Antikörper gerichtet ist, inkubiert. Anschließend wurde der mit dem jeweiligen Peptid gesättigte PRG-3- bzw. PRG-4-Antikörper mit dem Immunblot, der mit Totalproteinlysaten aus Rattengehirnen, P5 und den Fusionsproteinen PRG-3-eGFP bzw. PRG-4-eGFP beladen wurde, inkubiert.

4.2.1 Spezifität des PRG-3-Antikörpers

In Abbildung 4.5 A, links wurde der Immunblot mit dem PRG-3-Antikörper inkubiert. Der Antikörper erkannte das endogene und rekombinante PRG-3-Protein. Nach der vorherigen Inkubation des Antikörpers mit seinem Bindungspeptid im Überschuss wurde die Bande in der Spur des Fusionsproteins PRG-3-eGFP nicht mehr detektiert und eine deutliche Verringerung der Intensität des endogenen PRG-3 konnte verzeichnet werden (Abbildung 4.5 A, rechts). Parallel dazu wurde der Antikörper mit BSA als Kontrollpeptid vorher inkubiert (Abbildung 4.5 A, Mitte). Im Immunblot war kein Einfluss des BSA auf die Bindung des PRG-3-Antikörpers an das endogene und rekombinante PRG-3-Protein zu verzeichnen (Abbildung 3.5 A, Mitte). Als Ladungskontrolle wurde β-Actin nachgewiesen. Der Nachweis des Fusionsproteins erfolgte mit dem eGFP-Antikörper (Abbildung 4.5 B).



Abbildung 4.5: Dargestellt sind Immunblots beladen mit Totalproteinlysaten aus Rattengehirnen, P5 und rekombinantem PRG-3-eGFP. In der oberen Reihe A wurde der linke Blot mit dem PRG-3-Antikörper inkubiert. Bei dem mittleren Blot wurde der Antikörper vorher mit BSA als Kontrollpeptid inkubiert. Bei dem rechten Blot wurde der Antikörper zuvor mit dem Peptid inkubiert. Durch die Blockung des Antikörpers mit dem Peptid konnte die Bindung des Antikörpers an das endogene (schwarze Pfeile) und rekombinante (grüne Pfeilspitzen) PRG-3 inhibiert werden. In der unteren Reihe B sind die Kontrollentwicklungen der Immunblots mit dem β-Actin- und eGFP-Antikörper dargestellt. BP Bindungspeptid, Molekulargewicht in kDa (Prestained Protein Marker, New England Biolabs)

Darüber hinaus wurde der gleiche Versuch immunhistochemisch in Rattengehirnen von 15 Tage alten Tieren durchgeführt. Nach vorheriger Inkubation des PRG-3-Antikörpers mit dem im Überschuss vorliegenden Bindungspeptid konnte kein Immunprodukt mehr im Gewebe nachgewiesen werden (Abbildung 4.6). Der Antikörper wurde zur Kontrolle mit BSA inkubiert, um zu zeigen, dass die Bindung *in vivo* an PRG-3 nicht durch andere Proteine beeinflusst wird und der Antikörper BSA nicht unspezifisch erkennt (Abbildung 4.6).



Abbildung 4.6: Es ist die CA1-Region des Hippocampus in axialen Hirnschnitten 15 Tage alter Wistarratten dargestellt. Analog zu den Immunblots wurde der Schnitt in A nur mit dem PRG-3-Antikörper inkubiert. In B wurde der Antikörper zuvor mit BSA und in C mit dem Peptid inkubiert. Die negative Kontrolle ist in D dargestellt. Durch die Blockung des Antikörpers mit dem Peptid konnte eine Bindung an das endogene PRG-3-Protein *in vivo* inhibiert werden. CA1-Region des Cornu ammonis, DG Gyrus dentatus, BP Bindungspeptid, neg. K. negative Kontrolle, Maßstabsbalken: 200 µm

4.2.2 Spezifität des PRG-4-Antikörpers

Mit dem PRG-4-Antikörper wurde in Abbildung 3.7 A, links im Immunblot das endogene und rekombinante PRG-4-PRotein erkannt. Der PRG-4-Antikörper wurde ebenfalls mit dem im Überschuss eingesetzten Bindungspeptid vorher inkubiert, dabei konnte der PRG-4-Antikörper vollständig durch das Peptid gesättigt werden. Im Immunblot konnte danach kein Immunprodukt mehr detektiert werden (Abbildung 4.7 A, rechts). Bei der zusätzlichen Bande bei ca. 30 kDa in der Spur des Totalproteinlysats wird es sich um Proteinfragmente von PRG-4 handeln, die als spezifisch zu betrachten sind, da diese nach Sättigung des Antikörpers mit dem Peptid ebenfalls nicht mehr detektiert wurden. Eine parallele Inkubation des Antikörpers mit BSA zeigte, dass der Antikörper BSA nicht als sein Antigen erkannte. Danach erfolgte eine Kontrollentwicklung mit dem β-Actin- und eGFP-Antikörper (Abbildung 4.7 B).

Ergebnisse 57



Abbildung 4.7: Dargestellt sind Immunblots, die mit Totalproteinlysaten aus Rattengehirnen, P5 und dem Fusionsprotein PRG-4-eGFP beladen wurden. In A wurde der linke Immunblot mit dem PRG-4-Antikörper inkubiert. Im mittleren Blot wurde der Antikörper zuvor mit BSA und im rechten Blot mit dem Bindungspeptid inkubiert. Durch die Blockung des Antikörpers mit dem Peptid konnte die Bindung des Antikörpers an das endogene PRG-4 (schwarze Pfeile) und an das Fusionsprotein (grüne Pfeilspitzen) verhindert werden. In B sind die Kontrollentwicklungen der Immunblots mit dem ß-Actin- und eGFP-Antikörper dargestellt. BP Bindungspeptid, Molekulargewicht in kDa (Prestained Protein Marker, New England Biolabs)

In der Immunhistochemie führte die vorherige Inkubation des PRG-4-Antikörpers mit dem Bindungspeptid im Überschuss zu einer kompletten Inhibition der Färbung *in vivo* in Rattengehirnen 15 Tage alter Tiere (Abbildung 4.8 C). Die Färbung der Neurone war vollständig aufgehoben. Das BSA als Kontrollpeptid hatte nach voriger Inkubation mit dem Antikörper gegen PRG-4 keinen Einfluss auf die Intensität der Färbung und das Färbemuster (Abbildung 4.8 B).



Abbildung 4.8: Es ist die CA1-Region des Hippocampus in axialen Hirnschnitten 15 Tage alter Wistarratten dargestellt. Der Schnitt in A wurde mit dem PRG-4-Antikörper inkubiert. In B wurde der Antikörper zuvor mit BSA und in C mit dem Peptid inkubiert. Die negative Kontrolle ist in D dargestellt. Durch die Blockung des Antikörpers mit dem Peptid konnte eine Bindung an das endogene PRG-4 Protein *in vivo* inhibiert werden. CA1-Region des Cornu ammonis, DG Gyrus dentatus, BP Bindungspeptid, neg. K. negative Kontrolle, Maßstabsbalken: 200 µm

4.3 Vergleich zweier Methoden zur Proteinisolierung

Ein weiterer Test zur Überprüfung der Anwendbarkeit und Spezifität des PRG-3- bzw. PRG-4-Antikörpers war der Vergleich zweier Methoden zur Proteinisolierung, dem µMacs Kit und der Immunpräzipitation nach [151]. Beide Methoden eignen sich gut, um überexprimierte rekombinante Proteine aus Zelllinien zu isolieren. Die Fusionsproteine PRG-3-eGFP und PRG-4-eGFP wurden nach der Isolierung in einem Immunblot mit dem PRG-3- bzw. PRG-4-Antikörper nachgewiesen (Abbildung 4.9). Die bei allen Blots erscheinenden dicken Banden entsprechen den Mikrobeads aus der Immunpräzipitation, die bei der Aufreinigung im Lysat verbleiben und deshalb auf den Immunblots erscheinen (Abbildung 4.9). Beide Antikörper erkannten das jeweilige rekombinante Protein, das sowohl mittels dem µMacs Kit als auch mit Hilfe der Immunpräzipitation isoliert wurde.



Abbildung 4.9: Vergleich der Methoden zur Proteinaufreinigung, µMacs und Immunpräzipitation (IP). Mit beiden Methoden lassen sich PRG-3-eGFP und PRG-4-eGFP nach Überexpression aus COS-7-Zellen isolieren. In beiden Immunblots erscheinen die Banden auf der richtigen Höhe von 62 kDa (grüne Pfeile). Die schwarzen Pfeile weisen auf die Mikrobeads der Immunpräzipitation. Die blauen Pfeile weisen auf degradierte Proteinfragmente. Molekulargewicht in kDa (Prestained Protein Marker, New England Biolabs)

In einem erweiterten Versuch wurden die rekombinanten Proteine in der Immunpräzipitation mit dem monoklonalen eGFP-Antikörper und mit dem PRG-3- bzw. PRG-4-Antikörper isoliert (Abbildung 4.10). In diesem Versuch sollte getestet werden, ob die rekombinanten Proteine mit Hilfe des PRG-3- bzw. PRG-4-Antikörpers aus Zellen isoliert werden können. Das rekombinante PRG-3-Protein ließ sich in der Immunpräzipitation sowohl mit dem eGFP-Antikörper als auch mit dem PRG-3-Antikörper aus den Zellen isolieren. Das rekombinante PRG-4-Protein konnte hingegen nur mit dem eGFP-Antikörper aufgereinigt werden. Nach Aufreinigung des rekombinanten PRG-4-Proteins konnte dieses im Immunblot weder mit dem eGFP-Antikörper noch mit dem PRG-4-Antikörper detektiert werden. Zur Kontrolle wurden die Immunblots mit den rekombinanten Proteinen, die mittels der µMacs-Methode aufgereinigt wurden, ebenfalls aufgetragen. Sowohl der eGFP- als auch der PRG-3- bzw. PRG-4-Antikörper erkannten die so aufgereinigten Proteine. Als weitere Kontrolle wurde versucht, das eGFP-Protein mit dem PRG-3- bzw. PRG-4-Antikörper mittels Immunpräzipitation zu aus Zellen isolieren, um zu zeigen, dass beide Antikörper das eGFP-Protein nicht als ihr Zielantigen erkennen. Im Immunblot konnte anschließend kein eGFP-Protein mit Hilfe des eGFP-Antikörpers detektiert werden. Das eGFP-Protein, das mit Hilfe der µMacs-Methode isoliert wurde, diente als Kontrolle und wurde nur durch den eGFP-Antikörper erkannt (Abbildung 4.10, grüner Pfeil).



Abbildung 4.10: Vergleich der Isolierung von rekombinantem PRG-3-eGFP bzw. PRG-4-eGFP nach der μ Macs-Methode und der Immunpräzipitation (IP) mit Protein-A-Sepharose. Die rekombinanten Proteine werden in A durch den monoklonalen eGFP-Antikörper (IL-8) dargestellt (schwarze Pfeile). In B werden die rekombinanten Proteine links mit dem PRG-3- und rechts mit dem PRG-4-Antikörper dargestellt. Das eGFP-Protein dient als Kontrolle in der rechten Spur (grüne Pfeile). Die Mikrobeads der Immunpräzipitation sind mit blauen Pfeilen markiert. Die erste Spur zeigt die Isolierung der Fusionsproteine mit dem eGFP-Antikörper, die zweite Spur die Isolierung mit dem PRG-3- bzw. PRG-4-Antikörper, die dritte Spur die Isolierung mit der μ Macs-Methode, die vierte Spur die Isolierung des eGFP-Proteins mit dem PRG-3- bzw. PRG-4-Antikörper und die fünfte Spur im rechten Immunblot das eGFP-Protein, das über die μ Macs-Methode gewonnen wurde. Molekulargewicht in kDa (Prestained Protein Marker, New England Biolabs)

4.4 Testung verschiedener Immunhistochemie-Protokolle



Abbildung 4.11: Dargestellt ist eine DAB-Immunhistochemie mit dem PRG-3-Antikörper (A1 – A3) und dem PRG-4-Antikörper (B1 – B3) (axiale Schichten, Ratte P15). In A1 und B1 wurde das Detergenz Triton X-100 und als Blockierungslösung BSA verwendet. In A2 und B2 wurden die Schnitte mit Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend mit FCS blockiert. In A3 und B3 wurden das Detergenz Saponin und die Blockierungslösung FCS verwendet. Dargestellt ist die CA1-Region des Hippocampus. Maßstabsbalken: 100 μm

Um die optimale immunhistochemische Färbung für die beiden Proteine PRG-3 und PRG-4 für Expressionsanalysen zu erhalten, wurden verschiedene Detergenzien und Pufferlösungen mit den Antikörpern getestet (Abbildung 4.11). Die besten und im Vergleich ähnlichsten Ergebnisse ergaben die Detergenzien Stickstoff, Triton X-100 und Saponin. Obwohl zu erwähnen ist, dass mit dem Detergenz Triton X-100 die kräftigste Färbung mit beiden Antikörpern erzeugt werden konnte. Allerdings zeigte sich zusätzlich auch, dass das Gewebe durch Triton am stärksten angegriffen wurde und somit vermehrt Artefakte entstanden. Bei den Blockierungslösungen eigneten sich sowohl FCS als auch NGS. Eine alleinige Blockierung der unspezifischen Bindungen ohne vorher ein Detergenz verwendet zu haben, ergab das Phänomen, dass der Antikörper nicht durch alle Schichten der zwischen 30 und 50 µm dicken Schnitte gelangte und in der Mitte des Schnittes keine Färbung zu erkennen war.

4.5 PRG-3- und PRG-4-Expression in Zelllinien

Die Expression von PRG-3 und PRG-4 wurde mittels Immunblot in immortalisierten Tumorzelllinien untersucht, da bisher noch nicht analysiert wurde, ob endogenes PRG-3 bzw. PRG-4 in diesen Zelllinien exprimiert wird (Tabelle 4.3).

Die Zelllinie F98 ist eine murine Glioblastom-Zelllinie, die als Modell für Glioblastom-Zellen und Astrozyten *in vitro* genutzt werden kann [153]. Bv2-Zellen sind immortalisierte murine neonatale Mikroglia und werden als Modell für primäre Mikroglia in vielen Studien verwendet [154, 155]. N1E-115-Zellen sind Neuroblastomazellen, die ursprünglich aus dem murinen ZNS gewonnen wurden und als Modell für Neurone für *in vitro* Untersuchungen genutzt werden, da sie typische neuronale Eigenschaften, wie z.B. das Aussprossen von Neuriten besitzen und einige Rezeptoren für Neurotransmitter exprimieren [156, 157]. HEK 293-Zellen (human embryonic kidney cells) sind immortalisierte humane embryonale Nierenzellen, die sich aufgrund ihrer einfachen Handhabung und Kultivierung für *in vitro* Untersuchungen eignen [158].

Zelllinie	F98	Bv2	N1E-115	HEK 293
Herkunft	Glioblastoma	Immortalisierte	Neuroblastoma- Zelllinie	embryonale Nierenzelllinie
	[54]	[55, 56]	[57, 58]	[59]
Spezies	Maus	Maus	Maus	Mensch
PRG-3	eine Bande	multiple Banden bei	Banden bei 80	schwache Bande
Detektion im	bei 60 kDa	50 kDa, 42 kDa,	kDa, 45 kDa und	bei 60 kDa
Immunblot		32,5 kDa und 25	32,5 kDa	
		kDa		
PRG-4	eine Bande	multiple Banden bei	Banden bei 65	Banden bei 62
Detektion im	bei 42 kDa	65 kDa, 42 kDa, 28	kDa und 18 kDa	kDa und 18 kDa
Immunblot		kDa und 18 kDa		

Tabelle 4.3: Die Expression von PRG-3 und PRG-4 wurde mittels Immunblot in den Zelllinien F98, Bv2,N1E-115 und HEK 293 untersucht.

Der PRG-3-Antikörper detektierte in F98-Zellen und HEK 293-Zellen eine Bande bei 62 kDa und in Bv2-Zellen und N1E-115-Zellen multiple Banden. Der PRG-4-Antikörper detektierte eine Bande bei 42 kDa in F98-Zellen und multiple Banden in Bv2-Zellen, N1E-115-Zellen und HEK 293-Zellen (Tabelle 4.3).

4.6 PRG-3-Expression im sich entwickelnden Gehirn der Ratte

Savaskan *et. al* legten 2004 dar, dass die mRNA von PRG-3 bereits im embryonalen Stadium E16 in der hippocampalen Anlage, im Kortex, im Thalamus und im Bulbus olfactorius in Ratten exprimiert wird. Die Expression zeigte um den Geburtstermin ein Maximum und fiel postnatal kontinuierlich bis zum adulten Stadium ab [144]. In der Dissertation von Tanja Velmans wurde mittels quantitativer Real-time RT-PCR gezeigt, dass die mRNA von PRG-3 deutlich in den späten embryonalen und frühen postnatalen Stadien im Hippocampus, Kortex und Cerebellum exprimiert wird. Die Expression fiel dann ebenfalls kontinuierlich bis zum adulten Stadium ab [152]. Die Arbeitsgruppe um Z. Molnár konnte 2005 zeigen, dass die mRNA von PRG-3 in frühen postnatalen Stadien im dorsalen Kortex stärker exprimiert wird als im lateralen Kortex von Mäusen und schlussfolgerte daraus, dass PRG-3 in Entwicklungsprozesse der Kortikogenese involviert sein wird [159].

In dieser Arbeit sollte nun anlehnend an diese Vordaten untersucht werden, ob auf Proteinebene und *in vivo* in der Spezies Ratte ebenfalls eine Expressionsdynamik von PRG-3 während der Gehirnentwicklung vorliegt. Aus diesen Ergebnissen sollten Rückschlüsse auf etwaige Einflüsse bzw. Funktionen dieses Proteins auf Regulationsmechanismen der Gehirnentwicklung erarbeitet werden.

Die Expression des PRG-3-Proteins wurde im Immunblot, der mit Totalproteinlysaten aus Rattengehirnen der Entwicklungsstadien E13 bis P60 beladen wurde, untersucht. PRG-3 wurde bereits im Embryonalstadium E13 diskret detektiert und zeigte in den frühen postnatalen Stadien ein Maximum der Proteinexpression. Ab dem Stadium P10 fiel die Expression ebenfalls kontinuierlich wieder ab (Abbildung 4.12).


Abbildung 4.12: Immunblot, der mit jeweils 20 μg Totalproteinlysaten aus Rattengehirnen der Entwicklungsstadien: E13, E14, E15, E16, E17, E18, E19, E20, E21, P0, P5, P10, P15, P20, P30 und P60 beladen wurde (nicht beinhaltet sind der Hirnstamm und der Bulbus olfactorius). Das endogene PRG-3-Protein ist auf Höhe von ca. 47,5 kDa mit dem schwarzen Pfeil gekennzeichnet (A). Als Ladungskontrolle wurde β-Actin nachgewiesen (B). Molekulargewicht in kDa (Prestained Protein Marker, New England Biolabs)

Die PRG-3-Expression *in vivo* wurde im Kortex, Hippocampus und Cerebellum im Gehirn von Wistarratten in den Entwicklungsstadien E17 bis P30 mittels DAB-Immunhistochemie untersucht. Dabei zeigte sich auch ein dynamisches Expressionsmuster. In einer geringen Vergrößerung konnte ab dem embryonalen Stadium E17 ein PRG-3-Signal in den Neuronen der kortikalen Platte, der intermediären Zone, der subventrikulären Zone und der ventrikulären Zone des Kortex identifiziert werden (Abbildung 4.13, E17). In den Stadien P0 und P5 stieg die Intensität des PRG-3-Signals in den Schichten II, IV und V im Kortex weiter an. Ab dem Stadium P10 konnte ein starkes Signal in den Schichten II bis VI detektiert werden. Danach fiel das Signal in allen Schichten wieder leicht ab (Abbildung 4.13, P0 bis P30). Ein diskreter Gradient zwischen lateralem und dorsalem Kortex konnte ebenso beobachtet werden.



Abbildung 4.13: Dargestellt ist die PRG-3-Expression im sich entwickelnden Kortex der Wistarratte in einer kleinen Vergrößerung. Die DAB-Immunhistochemie wurde auf axial präpariertem Gehirngewebe der Stadien E17, P0, P5, P10, P15 und P30 durchgeführt. Im Stadium P30 wurden die sechs Schichten des Kortex mit I bis VI beschriftet. Im Stadium E17 wurden die MZ Marginalzone, CP kortikale Platte, SP Subplatte, IZ Intermediärzone und SVZ subventrikuläre Zone beschriftet, Maßstabsbalken: 250 µm

Übersichtsaufnahmen der DAB-Immunhistochemie von PRG-3 im Hippocampus zeigten eine erste Färbung von Neuronen in der hippocampalen Platte ab den embryonalen Entwicklungsstadium E17 (Abbildung 4.14, E17). Ab dem Stadium E21 konnten die Körnerzellen des Gyrus dentatus das erste Mal detektiert werden (Abbildung 4.14, E21). Die Proteinexpression von PRG-3 stieg in den frühen postnatalen Stadien bis zum Stadium P10 im Gyrus dentatus und im Cornu ammonis stark an. Ab dem Stadium P15 nahm die Intensität dann wieder kontinuierlich bis zum Stadium P30 ab (Abbildung 4.14, P0 bis P30).



Abbildung 4.14: Dargestellt ist die PRG-3-Expression im Hippocampus (axiale Schichten, Wistarratte) mittels DAB-Immunhistochemie in den Entwicklungsstadien E17, E21, P0, P5, P10, P15 und P30. CA1 und CA3 Cornu ammonis- Region, DG Gyrus dentatus, Hi Hilus, neg. K. negative Kontrolle (Stadium P15), Maßstabsbalken: 250 µm

Das PRG-3-Protein wurde im Cerebellum in den immunhistochemischen Untersuchungen ab dem Entwicklungsstadium P0 analysiert, da in den spätembryonalen Stadien noch keine PRG-3-Expression zu detektieren war. Ab diesem Entwicklungsstadium beginnen die reifen Körnerzellen, die Neurone der Kerngebiete und die meisten Interneurone zu migrieren. Ferner beginnt die Ausbildung der Dendritenbäume der Purkinjezellen [163].

Ein starkes PRG-3-Signal konnte in den Körnerzellen und in den tiefen Kerngebieten bereits in der geringen Vergrößerung gezeigt werden (Abbildung 4.15, P0 und P5). In den postnatalen

Stadien P10 bis P30 konnte PRG-3 stark in der Körnerzellschicht, in den Purkinjezellen und ihren Dendriten und in den Neuronen der Kerngebiete detektiert werden (Abbildung 4.15, P10 bis P30). Die Expression blieb im Gegensatz zum Kortex und zum Hippocampus stark präsent und fiel nur mäßig bis in das adulte Alter ab.



Abbildung 4.15: Dargestellt ist die PRG-3-Expression im Cerebellum (axiale Schichten, Wistarratte) mittels DAB-Immunhistochemie in den Entwicklungsstadien P0, P5, P10, P15 und P30. DN tiefe Kerngebiete, ML Molekularschicht, PCL Purkinjezellschicht, GCL Körnerzellschicht, neg. K. negative Kontrolle (Stadium P15), Maßstabsbalken: 250 µm

4.6.1 Analyse des feinmorphologischen Expressionsmusters von PRG-3

Bereits in den Übersichtsaufnahmen vom Kortex und vom Hippocampus in den aufsteigenden Entwicklungsstadien konnte eine starke und dynamische neuronale Expression von PRG-3 beobachtet werden. In höheren Vergrößerungen zeigte sich die stärkste Expression von PRG-3 im spätembryonalen Stadium E17 im Kortex in den Neuronen der oberen Schichten der kortikalen Platte und in der Subplatte (Abbildung 4.16, E17). Daraus und aus bekannten Vordaten [92, 144, 145, 159] lässt sich schlussfolgern, dass PRG-3 in Entwicklungsprozesse des ZNS, wie die Neurogenese sowie in die Initiierung und Aussprossung von neuronalen Fortsätzen involviert sein kann. In der kortikalen Platte befinden sich junge postmitotische Neurone, die aus der ventrikulären und subventrikulären Zone migriert sind [49]. Die Subplatte besteht während der Entwicklung aus jüngst geborenen Neuronen, die u. a. die Vorlage für die Kortexschichtung darstellen und den Weg für erste subkortikale und kontralaterale Projektionen ebnen [160, 161]. Ab dem Stadium P0 war eine deutliche Färbung der Neurone in den Schichten II, IV und V im Neokortex des Frontal-, Parietal-, Occipital- und Temporallappen zu identifizieren (Abbildung 4.16, P0). Ab dem Stadium P5 konnten Dendriten von den Neuronen im Kortex abgegrenzt werden. Dabei fiel auf, dass das Signal im proximalen Part der Dendriten am deutlichsten zu identifizieren war (Abbildung 4.16, P10 bis P30, schwarze Pfeile). Beim Vergleich der postnatalen Entwicklungsstadien fiel auf, dass die Dendriten in den frühen Entwicklungsstadien über eine längere Distanz verfolgt werden konnten. Mit Zunahme des Alters der Tiere waren die Dendriten nur noch im proximalen Part am Zellsoma zu erkennen, wohingegen der distale Teil nicht mehr identifiziert werden konnte (Abbildung 4.16, P15 und P30). Die Intensität der Expression von PRG-3 zeigte ab dem Stadium P0 eine Zunahme bis zum Stadium P10 und fiel dann kontinuierlich ab.

Im spätembryonalen Stadium E17 wurde das PRG-3-Immunprodukt im Hippocampus in der ventrikulären Zone und der hippocampalen Platte gefunden. Während die neuronalen Strukturen in der Area dentata nur dezent zur Darstellung kamen (Abbildung 4.17, E17). Um den Geburtstermin herum (Stadien E21 und P0) konnten die Pyramidenzellen im Cornu ammonis und Hilus deutlich detektiert werden. Zum diesem Entwicklungszeitpunkt waren vor allem die Körnerzellen des Gyrus dentatus stark gefärbt (Abbildung 4.17, P0).

Analog zum Kortex ließen sich ab den frühen postnatalen Stadien die proximalen Abschnitte der Dendriten der Neurone in der CA1- und CA3-Region und im Gyrus dentatus detektieren. Die Intensität der Färbung nahm in den weiteren postnatalen Stadien bis zum Stadium P15 zu (Abbildung 4.17, P10 und P15) und dann kontinuierlich wieder ab.



Abbildung 4.16: Expression von PRG-3 im sich entwickelnden Kortex in den Stadien E17, P0, P5, P10, P15 und P30 (axiale Schichten, Wistarratte). Die schwarzen Pfeile in den Abbildungen P5, P10, P15 und P30 weisen auf Dendriten. CP kortikale Platte, SP Subplatte, IZ Intermediärzone, I-VI Schichtung im Kortex, Neg. K. negative Kontrolle (Stadium P5), Maßstabsbalken: E17 bis P0 und neg. K.: 100 μm; P5 bis P30: 50 μm



Abbildung 4.17: Expression von PRG-3 im sich entwickelnden Hippocampus in den Stadien E17, P0, P5, P10, P15 und P30 (axiale Schichten, Wistarratte). Im Hippocampus wird als repräsentatives Beispiel die CA1-Region des Cornu ammonis dargestellt. Str. or. Stratum oriens, Str. rad. Stratum radiatum, Str. lac./mol. Stratum lacunosum moleculare, DG Gyrus dentatus, Hi Hilus, HP hippocampale Platte mit CA1- und CA3-Region, VZ ventrikuläre Zone, AD Area dentata, neg. K. negative Kontrolle (Stadium P15), Maßstabsbalken: E17 bis P0 und neg. K.: 100 µm; P5 bis P30: 50 µm

Die äußere Molekularschicht des Gyrus dentatus, in die Axone aus dem Entorhinalkortex als Tractus perforans projizieren, zeigte ein diskret stärkeres PRG-3-Signal als die innere Molekularschicht (Abbildung 4.18). Diese Beobachtung implizierte, dass PRG-3 in synaptischen Kontakten zwischen den afferenten Axonterminalen des Tractus perforans und den Dendriten der Körnerzellen exprimiert wird.



Abbildung 4.18: PRG-3-Expression im Gyrus dentatus in den Entwicklungsstadien P5, P10 und P20 (axiale Schichten, Wistarratte). Mit den schwarzen Pfeilen wurden die innere (iml) und äußere Molekularschicht (oml) über der Körnerzellschicht markiert. DG Gyrus dentatus, Hi Hilus, CA3 CA3-Region des Cornu ammonis, Maßstabsbalken: 200 µm

PRG-3 konnte im Cerebellum ab dem Entwicklungsstadium P0 identifiziert werden. Dabei wiesen die reifenden Körnerzellen eine besonders starke Färbung in den frühen postnatalen Entwicklungsstadien auf (Abbildung 4.19, P0 und P5). Zusätzlich zeigte sich ein starkes PRG-3-Signal in den tiefen Kerngebieten und ein deutlich schwächeres Signal in Purkinjezellen (Abbildung 4.19, P0). Ab dem Stadium P5 präsentierte sich in höheren Vergrößerungen die typische Architektur des Cerebellums. PRG-3 konnte ab dem Stadium P10 stark in den Körnerzellen, in den Purkinjezellen und in den Dendritenbäumen der Purkinjezellen gefunden werden. Während der postnatalen Entwicklung stieg die Intensität von PRG-3 zunächst bis zum Stadium P15 an und fiel dann während der weiteren Entwicklung geringfügig wieder ab (Abbildung 4.19, P10 bis P30).

Eine zeitabhängige Expression der PRG-3-mRNA und des -Proteins wurde in mehreren Analysen demonstriert. Auf Proteinebene in der Spezies Ratte wurde das Expressionsmuster von PRG-3 bisher noch nicht systematisch untersucht. Die Ergebnisse in dieser Arbeit bestätigen eine dynamische Expression des PRG-3-Proteins in den drei näher untersuchten Regionen im Gehirn der Ratte während der spätembryonalen und postnatalen Entwicklung.



Abbildung 4.19: PRG-3-Expression im postnatalen Cerebellum (axiale Schichten, Wistarratte) in den Entwicklungsstadien P0, P5, P10, P15 und P30. ML Molekularschicht, PCL Purkinjezellschicht, GCL Körnerzellschicht, iGCL innere Körnerzellschicht, eGCL äußere Körnerzellschicht, neg. K. negative Kontrolle (Stadium P15). Die Purkinjezellen sind mit blauen Pfeilen markiert. Die Dendriten der Purkinjezellen sind mit schwarzen Pfeilen markiert. Maßstabsbalken: P0, P5 und P10: 100µm; P15, P30 und neg. K.: 50 µm

4.6.2. Immunhistochemische Verteilung von PRG-3 im postnatalen Rattengehirn

Das PRG-3-Immunprodukt konnte in der DAB-Immunhistochemie in postnatalen axialen Schichten von Rattengehirnen der Stadien P0, P5, P10, P15 und P30 in Neuronen nahezu jeder untersuchten Region gefunden werden (Tabelle 4.4). Direkt nach der Geburt (Stadium P0) zeigte sich besonders in den Neuronen im Kortex, Septum, Hippocampus, Thalamus und Hirnstamm ein intensives Immunprodukt. Sehr ausgeprägt war die Färbung in den Schichten II, IV und V des Kortex, in der CA-Region des Hippocampus, im Thalamus und in der Mehrzahl von Kerngebieten im Hirnstamm. Fünf Tage nach der Geburt gipfelte die Intensität der Färbung vor allem in den Schichten II, IV und V des Kortex, im Septum, im Gyrus dentatus und Ammonshorn des Hippocampus. Dabei waren vor allem Pyramidenzellen und einige Interneurone zu finden. Die Stärke des Signals blieb im Hippocampus bis zum Stadium P15 bestehen. Im Kortex, Septum und Thalamus kam es bereits zu einer sichtbaren Abnahme des PRG-3-Signals ab dem Stadium P15. Im Stadium P30 war die Expression nahezu ubiquitär deutlich zurückgegangen. Im Cerebellum wurde PRG-3 ab dem Stadium P0 schwach in Purkinjezellen und etwas stärker in den jungen Körnerzellen gefunden. Die Intensität der Expression stieg dann weiter an und erreichte um das Stadium P15 ihr Maximum. Im Stadium P30 fiel die Intensität des PRG-3-Signals leicht wieder ab. Die Dendriten der Purkinjezellen waren ab dem Stadium P10 deutlich zu erkennen und auch in den späteren postnatalen Stadien deutlich PRG-3 immunreaktiv.

Region	P0	P5	P10	P15	P30				
Kortex									
Neokortex: Frontal-, Parietal-	, Temporal-, C	Occipitalkortex							
Kortexschicht I	+	+	-	-	-				
Kortexschicht II	1 ++++	2 ++++	2 +++	1 +++	1 ++				
Kortexschicht III	1 +++	2 +++	2 +++	1 ++	1 ++				
Kortexschicht IV,V	1 ++++	2 ++++	2 +++	2 +++	1 ++				
Kortexschicht VI	1 +++	2 +++	2 +++	1 +++	1 ++				
Gyrus cinguli	1 +++	1 ++++	1 ++++	1 +++	1 ++				
Bulbus olfactorius	1 ++	1 +++	1 +++	1 +++	1 ++				
Corpus callosum	+	+	+	+	+				
Commissura anterior	+	+	+	+	+				
Striatum (Ncl. caudatus,	1 ++	1 ++	1 ++	1 ++	1 ++				
Putamen)									
Globus pallidus	1 +++	1 +++	1 +++	1 ++	1 ++				
Nucleus accumbens	1 ++	1 ++	1 ++	1 ++	1 ++				
Teania tecta	1 ++	1 +++	1 +++	1 ++	1 ++				

Septum									
Nucleus septohippocampalis	1 +	1 +	1 +	1 +	1 +				
Nucleus septalis lateralis	1 ++++	1 ++++	1 +++	1 +++	1 +++				
Nucleus septalis medialis	1 ++	1 ++	1 ++	1 ++	1 ++				
Nucleus septofimbrialis	1 ++	1 ++	1 ++	1 ++	1 ++				
Nucleus septalis triangularis	1 +++	1 +++	1 +++	1 +++	1 ++				
Subfornicales Organ	1 ++++	1 ++++	1 +++	1 +++	1 ++				

Thalamus									
Nucleus reuniens	1 ++	1 ++	1 ++	1 ++	1 +				
Nucleus reticularis	1 +++	1 +++	1 ++	1 ++	1 +				
Nucleus ventralis	1 ++++	1 ++++	1 +++	1 +++	1 ++				
posteriomedialis									
Nucleus ventralis	1 ++++	1 ++++	1 +++	1 +++	1 ++				
posteriolateralis									
Nucleus posteriolateralis	1 +++	1 ++++	1 +++	1 ++	1 ++				
Nucleus laterodorsalis	1 +++	1 ++++	1 +++	1 ++	1 ++				
Nucleus intermediodorsalis	1 +++	1 +++	1 +++	1 ++	1 ++				
Posteriore thalamische	1 ++++	1 ++++	1 +++	1 ++	1 ++				
Kerngruppe									
Nucleus rhomboideus	1 +++	1 +++	1 +++	1 ++	1 ++				
Nucleus submedius	1 +++	1 +++	1 +++	1 ++	1 ++				
Nucleus anteroventralis	1 ++++	1 ++++	1 +++	1 ++++	1 ++				
Nucleus subthalamicus	1 ++++	1 ++++	1 +++	1 ++	1 ++				
Stria terminalis	+	+	+	+	+				

Hippocampale Formation					
Ammonshorn CA1- CA3:					
Stratum oriens	1 +	1 +	1 +	1 +	1 +
Stratum pyramidale	1 +++	2 ++++	2 ++++	1 ++++	1 +++
Stratum radiatum	1 +	1 +	1 +	1 +	1 +
Gyrus dentatus:					
Körnerzellschicht	1 ++	2 ++++	2 ++++	1 ++++	1 +++
Molekularschicht	1 +	1 +	1 +	1 +	1 +
Hilus	1 +++	1 ++++	2 ++++	1 +++	1 ++
Fimbria hippocampus	+	+	+	+	+
Amygdalohippocampales	1 +++	1 +++	1 +++	1 ++	1 ++
Areal					
Subiculum	1 +++	1 +++	1 +++	1 +++	1 ++
Parasubiculum	1 +++	2 +++	2 +++	1 +++	1 ++
Präsubiculum	1 +++	1 +++	2 +++	1 +++	1 ++
Alveus	+	+	+	+	+
Entorhinalkortex	1 +++	1 +++	2 +++	1 +++	1 ++

Diencephalon									
Nucleus habenularis medialis	1 ++	1 +++	1 +++	1 ++	1 ++				
laterale Habenula	1 +	1 ++	1 ++	1 ++	1 +				
mediale Habenula	1 +	1 +++	1 +++	1 ++	1 ++				
Commissura posterior	+	+	+	+	+				

Hypothalamus					
Nucleus posterior	1 ++++	1 ++++	1 +++	1 +++	1 ++
Area hypothalamicus anterior	1 +++	1 +++	1 +++	1 +++	1 ++

Mesencephalon, Pons und Medulla oblongata									
Nucleus geniculatum laterale	1 ++++	1 ++++	1 +++	1 +++	1 ++				
Nucleus geniculatum medialis	1 +++	1 +++	1 +++	1 +++	1 ++				
Nuclei pontis	1 ++++	1 ++++	1 +++	1 ++	1 ++				
Nucleus reticularis	1 +++	1 +++	1 +++	1 ++	1 ++				
Nucleus raphe medianus	1 ++	1 ++	1 ++	1 +	1 +				
Substantia nigra, Pars	1 +++	1 +++	1 +++	1 +++	1 ++				
compacta									
Substantia nigra, Pars	1 +++	1 +++	1 +++	1 ++	1 ++				
reticularis									
Nucleus ruber	1 ++	1++	1++	1++	1++				
Nucleus pararubralis	1 ++++	1 ++++	1 +++	1 +++	1++				
Nucleus dorsoventralis des	1 +++	1 +++	1 +++	1 +++	1 ++				
Lemniskus lateralis									
Zentrales Grau	1 +++	1 +++	1 +++	1 +++	1++				
Nucleus laterodorsalis	1 +++	1 +++	1 +++	1 +++	1 ++				
tegmentalis									
Decussatio pedunculorum	1 ++	1 ++	1 ++	1 ++	1 ++				
cerebellarium superiorum									
Nucleus mesencephalicus	1 ++	1++	1++	1++	1++				
Nucleus trochlearis	1 ++++	1 ++++	1 +++	1 +++	1++				
Nucleus principalis	1 ++++	1 ++++	1 +++	1 +++	1 ++				
oculomotorii									
Nucleus cerebellaris medialis	1 +++	1 +++	1 +++	1++	1++				
Periaqueductales Grau	1 +++	1 +++	1 +++	1++	1++				
Nucleus centralis des	1 +++	1 +++	1 +++	1 ++	1 ++				
Colliculus inferior									
Nucleus mesencephalicus	1 +++	1 +++	1 +++	1 +++	1 ++				
trigemini									

Cerebellum									
Körnerzellschicht	1 +++	1 +++	1 +++	1 +++	1 ++				
Purkinjezellschicht	1 +	1 ++	2 +++	2 +++	2 +++				
Molekularschicht	+	+	+	+	+				
tiefe Kerngebiete	1 ++	1 +++	1 +++	1 +++	1 ++				

Tabelle 4.4: Tabellarische Darstellung der Expression von PRG-3 im sich entwickelnden postnatalen Gehirn der Ratte. – kein PRG-3-Signal, + schwaches PRG-3-Signal, ++ moderates PRG-3-Signal, +++ starkes PRG-3-Signal, +++ sehr starkes PRG-3-Signal in den Somata von Neuronen und in den Oligodendrozyten in Fasertrakten. 1 schwaches PRG-3-Signal, 2 moderates PRG-3-Signal in den Dendriten. Pro Entwicklungsstadium wurden n= 5 Tiere verwendet.

4.7 PRG-3 wird von Interneuronen exprimiert

Das PRG-1-Protein wird nur in exzitatorischen Neuronen exprimiert und lässt sich nicht mit den Calcium-bindenden Proteinen Calretinin, Calbindin und Parvalbumin kolokalisieren [142]. PRG-3 wies in der DAB-Immunhistochemie eine fast ubiquitäre Expression in Neuronen auf. Aufgrund der phylogenetischen Verwandtschaft von PRG-1 und PRG-3 und der starken Expression von PRG-3 in Neuronen sollte mittels Doppelimmunfluoreszenz untersucht werden, ob PRG-3 mit den Markerproteinen Calretinin, Calbindin und Parvalbumin in den Regionen Hippocampus, Kortex und Cerebellum kolokalisiert werden kann und damit u. a. auch in GABAergen Interneuronen lokalisiert ist.

Interneurone können neben ihrer Morphologie auch nach der Expression Calcium-bindender Proteine charakterisiert werden. Obwohl die Subpopulationen der Neurone, die Calretinin, Calbindin und Parvalbumin exprimieren heterogen sind, eignen sich diese als Calciumpuffer dienenden Proteine, um diese Proteine exprimierende GABAerge Interneurone zu lokalisieren [162]. Alle drei Proteine zeigen ein eher komplementäres Vorkommen in den neuronalen Subpopulationen in vielen Regionen des ZNS, obgleich ein kleiner Teil der Neurone überlappend insbesondere Parvalbumin und Calbindin bzw. Calbindin und Calretinin exprimieren [163 -165]. Daneben werden Parvalbumin und Calbindin auch von den Purkinjezellen im Cerebellum exprimiert [166]. Calretinin wird z.B. im Hippocampus und Kortex bei Nagern von nicht-pyramidalen GABAergen Neuronen exprimiert [167 - 168]. Parvalbumin wird im Gegensatz zu Calretinin nur in einer Subpopulation von GABAergen Interneuronen im Hippocampus und Kortex exprimiert [167, 169]. Calbindin exprimierende nicht- pyramidale Neurone können in nahezu allen Schichten und Subregionen des Hippocampus, vor allem im Stratum radiatum der CA1- und CA3-Region und im Stratum oriens und im Kortex gefunden werden [167, 170]. Calbindin wird zusätzlich auch von pyramidalen Neuronen der CA1-Region und von Körnerzellen des Gyrus dentatus exprimiert.

PRG-3 konnte im Hippocampus und Kortex in Parvalbumin-positiven und Calbindin-positiven Neuronen kolokalisiert werden (Abbildung 4.20 A und C). Axone und Dendriten dieser Interneurone waren hingegen kaum PRG-3 immunreaktiv. Im Stratum radiatum und Stratum oriens des Hippocampus wurde PRG-3 in Calbindin positiven Interneuronen kolokalisiert. Im Hilus, im Stratum radiatum und im Kortex konnte PRG-3 ebenfalls mit Calretinin kolokalisiert werden (Abbildung 4.20 B).



Abbildung 4.20: Exemplarische konfokale Aufnahmen von Doppelimmunfluoreszenzstudien im Hippocampus und Kortex (axiale Schichten, Stadium P15). In A ist das PRG-3-Protein mit Parvalbumin (Parv) im Kortex, Schicht IV dargestellt. In B ist PRG-3 mit Calretinin im Kortex, Schicht II kolokalisiert. In C ist PRG-3 mit Calbindin im Stratum radiatum der CA1-Region kolokalisiert. Die weißen Pfeile weisen auf die kolokalisierten Interneurone. Die gelben Pfeile (A und B) weisen auf Axone der Neurone, die nicht PRG-3 immunreaktiv sind. S Subiculum, Str. rad. Stratum radiatum. In A sind rechts oben beispielhaft negative Kontrollen dargestellt, Maßstabsbalken: A 12,5 µm, B 25 µm, C 75 µm

Es wurde in den Doppelimmunfluoreszenzuntersuchungen beobachtet, dass die Mehrheit der Neurone, die diese Markerproteine exprimierten, mit einer schwächeren Intensität PRG-3 immunreaktiv war. Es ergab sich durch diese Konstellation der Beleg, dass PRG-3 nicht nur von Projektionsneuronen sondern auch von Interneuronen exprimiert wird.

4.8 Expression von PRG-3 im Cerebellum

Dass PRG-3 in den Purkinjezellen, Körnerzellen und in den Neuronen der Kerngebiete im Cerebellum stark exprimiert wird, wurde bereits in der DAB-Immunhistochemie demonstriert. PRG-3 konnte dementsprechend mit Parvalbumin und Calbindin in den Purkinjezellen und Körnerzellen im Cerebellum kolokalisiert werden (Abbildung 4.21 A und B). Ferner wurde PRG-3 in Calretinin-immunreaktiven Interneuronen detektiert (Abbildung 4.21 C).



Abbildung 4.21: Beispielhafte konfokale Immunfluoreszenzdoppelfärbung im Cerebellum (axiale Schichten, Stadium P15). In A Kolokalisation von PRG-3 mit Parvalbumin (Parv), weiße Pfeile weisen auf Purkinjezellen, gelbe Pfeile weisen auf ein Interneuron. In B Kolokalisation von PRG-3 mit Calbindin, weiße Pfeile weisen auf Purkinjezellen und gelbe Pfeile auf die Dendriten. In C Kolokalisation von PRG-3 mit Calretinin, weiße Pfeile weisen auf kolokalisierte Neurone in der Körnerzellschicht. GCL Körnerzellschicht, PCL Purkinjezellschicht und ML Molekularschicht, Maßstabsbalken: A 25 µm, B 25 µm, C 25 µm

4.9 Identifizierung von PRG-3 in der neuronalen Konnektivität

PRG-3 konnte in der DAB-Immunhistochemie ab den Entwicklungsstadium P15 vornehmlich im proximalen Bereich von Dendriten identifiziert werden. In einer Doppelimmunfluoreszenz mit dem mikrotubuli-assoziierten Dendritenmarker MAP2 [171] wurde gezeigt, dass in den Somata und im proximalen Part von Dendriten PRG-3 mit MAP2 koexisitierte. In den distalen Bereichen der Dendriten konnte nur noch ein schwaches PRG-3-Immunprodukt identifiziert werden (Abbildung 4.22 A). PRG-3 konnte auch im proximalen Part der Dendriten der Körnerzellen des Gyrus dentatus lokalisiert werden (Abbildung 4.22 B). Des Weiteren wurde untersucht, ob PRG-3 im Stratum lucidum der CA3-Region mit Calbindin kolokalisiert ist. Es fiel auf, dass sich das PRG-3-Signal im Stratum lucidum, in dem die Axonterminalen der Körnerzellen des Gyrus dentatus mit den Dendriten der Pyramidenzellen der CA3-Region interagieren, teilweise dem mit Calbindin-Signal überlagerte (Abbildung 4.22 C). In der DAB-Immunhistochemie konnte nicht immer eindeutig identifiziert werden, ob PRG-3 rein dendritisch oder zusätzlich auch in Axonterminalen lokalisiert war. Tanja Velmans zeigte in ihrer Dissertationsarbeit, dass PRG-3 in vitro in reifen primären Neuronen der Spezies Maus deutlich mit dem mikrotubuli-assoziierten Protein und axonalen Marker Tau1 kolokalisierbar war [152, 172]. Demzufolge sollte mittels Doppelimmunfluoreszenzstudien mit Tau1 überprüft werden, ob PRG-3 in vivo in der Spezies Ratte auch in Axonen lokalisiert ist. Es ließ sich keine Kolokalisation von PRG-3 mit Tau1 in Fasertrakten, wie dem Moosfasertrakt, beobachten (Abbildung 4.22 D). In Fasertrakten, wie der anterioren Kommissur und im Corpus callosum konnte ein PRG-3-Immunprodukt lediglich in Oligodendrozyten detektiert werden (Abbildung 4.25).

PRG-3 konnte außerdem mit Calbindin in der Körnerzellschicht und den proximalen Abschnitten ihrer Dendriten des Gyrus dentatus kolokalisiert werden. Zusätzlich fiel auf, dass PRG-3 auch in den basaler lokalisierten jüngeren Körnerzellen zu finden war (Abbildung 4.22 B). Das PRG-3-Signal imponierte sowohl in der DAB-Immunhistochemie als auch in der Immunfluoreszenz stark gepunktet, als sei das Protein in Zellmembranen aggregiert. Das gepunktete Immunprodukt von PRG-3 war vor allem in den Somata und proximalen Abschnitten der Dendriten von Neuronen lokalisiert.



Abbildung 4.22: Beispielhafte konfokale Aufnahmen von Doppelimmunfluoreszenzstudien von PRG-3 im Hippocampus (axiale Schichten, Stadium P15), in A mit dem Dendritenmarker MAP2 im Kortex, Schicht IV, in B und C mit Calbindin im Gyrus dentatus und der CA3-Region. In B wird mit den weißen Pfeilen auf die Kolokalisation der Körnerzellen und mit den gelben Pfeilen auf die Kolokalisation der Dendriten fokussiert. In C fokussieren die gelben Pfeilen auf das Stratum lucidum (Str. luc.), das die Projektionen des Moosfasertrakts der Körnerzellen des Gyrus dentatus aufweist. In D ist PRG-3 mit dem axonalen Markerprotein Tau1 dargestellt. Es zeigt sich, das PRG-3 nicht mit Tau1 immunreaktiv ist. Maßstabsbalken: A 25 µm, B 25 µm, C 20 µm, D 20 µm

Vordaten zu PRG-1 ergaben, dass es eine spezifische Rolle durch seine Interaktion mit Lipidphosphaten bei der Signalübertragung an exzitatorischen glutamatergen Synapsen über präsynaptische LPA₂-Rezeptoren spielt. Die PRG-1-Expression wurde ausschließlich in Dendriten von glutamatergen Neuronen gefunden [142]. In der Arbeit von Tanja Velmans konnte PRG-3 mit präsynaptischen Markern *in vitro* in primären Neuronen der Maus kolokalisiert werden. Es sollte nun im Rattengehirn analysiert werden, ob PRG-3 mit den präsynaptischen Markern Synaptophysin, VGat und VGlut 1 und 2 auch *in vivo* kolokalisiert werden kann. Synaptophysin ist ein vesikuläres Membranprotein, das auf allen präsynaptischen Vesikeln vorkommt und sich deshalb als allgemeiner Marker für Synapsen eignet [173]. VGlut 1 und VGlut 2 sind vesikuläre Glutamattransporter, die komplementär exprimiert werden und als Marker für exzitatorische glutamaterge Synapsen verwendet werden [174]. VGat ist ein vesikulärer GABA-Transporter, der als Marker für inhibitorische Synapsen verwendet wird [175].

PRG-3 ließ sich in den proximalen Abschnitten von Dendriten nachweisen und erschien aggregiert in der Zellmembran. Das gepunktete PRG-3-Signal war in der inneren Molekularschicht des Gyrus dentatus und in den Bereichen der synaptischen Kontakte zwischen den axonalen Endigungen der entorhinalen Kortexneurone und den Dendriten der Körnerzellen zu finden (Abbildung 4.23 A). In einigen Bereichen konnte eine Überlagerung von PRG-3 mit Synaptophysin identifiziert werden (Abbildung 4.23 A, jeweils weiße Pfeile). Mit VGlut 1, VGlut 2 und VGat konnte PRG-3 ebenfalls zu einem kleinen Teil im Kortex und Hippocampus kolokalisiert werden. (Abbildung 4.23 B – D). Damit wurde gezeigt, dass PRG-3 zumindest teilweise in präsynaptischen Strukturen von inhibitorischen und exzitatorischen Synapsen lokalisiert ist.



Abbildung 4.23: Exemplarische konfokale Aufnahmen von Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von PRG-3 mit präsynaptischen Markern (axiale Schichten, Stadium P15). In A ist die Kolokalisation von PRG-3 mit Synaptophysin in der inneren Molekularschicht (iml) des Gyrus dentatus dargestellt. Die Abbildung in B zeigt eine Kolokalisation von PRG-3 mit VGlut 1 im Kortex, Schicht III. In C ist PRG-3 mit VGlut 2 im Stratum radiatum (Str. rad.) der CA-Region kolokalisiert. In D wird PRG-3 mit VGat in der Schicht III des Kortex dargestellt. In allen Abbildungen wird ersichtlich, dass das gepunktete PRG-3 Signal zu einem geringen Teil mit dem Signal des jeweiligen Markers kolokalisiert ist (weiße Pfeile). Maßstabsbalken: A 10 μ m, B 10 μ m, C 5 μ m, D 5 μ m

4.10 PRG-3-Expression in Gliazellen

Zur weiteren Charakterisierung des Expressionsmusters von PRG-3 in vivo wurde außerdem untersucht, ob PRG-3 in Gliazellen lokalisiert ist. Im Immunblot, der mit Proteinlysaten aus den Zelllinien F98 und Bv2 beladen wurde, wurden mehrere Banden durch den PRG-3-Antikörper detektiert. Diese Zelllinien stellen allerdings nur ein Modell für Astrozyten bzw. Mikroglia dar Umständen nicht die Expression wieder. Durch und geben unter in vivo Doppelimmunfluoreszenzfärbungen mit dem Astrozytenmarker **GFAP** und dem Mikrogliamarker IB4 sollten etwaige Kolokalisationen verifiziert werden.

GFAP ist ein gliales fibrilläres saures Protein, das als Intermediärfilament vornehmlich von Astrozyten exprimiert wird. Es gilt als Standardmarker für reife Astrozyten. Das Glykoprotein Isolectin B4 ist ein Mikrogliamarker, der gleichzeitig auch Endothelzellen markiert [176].



Abbildung 4.24: Exemplarische konfokale Darstellung der Doppelimmunfluoreszenz von PRG-3 mit dem Astrozytenmarker GFAP und dem Mikrogliamarker IB4 (axiale Schichten, Stadium P15). In A wurde PRG-3 mit GFAP im Kortex kolokalisiert. In B wurde PRG-3 mit IB4 kolokalisiert. Es zeigt sich jeweils keine Kolokalisation in der Überlagerung in den rechten Abbildungen. Maßstabsbalken: A 25 µm, B 5 µm

In den Kolokalisationsuntersuchungen mit GFAP war in konfokalen Aufnahmen keine Überlagerung der Färbungen von GFAP mit PRG-3 zu erfassen. PRG-3 konnte ebenso nicht mit IB4 in Mikroglia kolokalisiert werden. Endogen scheint PRG-3 schließlich nicht in Mikroglia vorzukommen (Abbildung 4.24 A und B, weiße Pfeile). Diese Ergebnisse stehen in Kongruenz mit den Daten aus der Dissertationsarbeit von Tanja Velmans, die bei Analysen von primären Astrozyten und Mikroglia kaum eine PRG-3-mRNA und kein PRG-3-Protein in diesen Zellen detektierte.

Des Weiteren wurden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen mit den Oligodendrozytenmarkern CNPase, NG2 und O4 durchgeführt. Der CNPase-Antikörper erkennt als sein Antigen die 2', 3'zyklische nucleotide 3'-Phosphodiesterase, ein Enzym, das von Oligodendrozyten aller Reifestadien, insbesondere aber von maturen Oligodendrozyten, exprimiert wird. CNPase wird bereits sehr früh in Oligodendrozyten exprimiert. Es eignet sich als Standardmarker für alle Reifestadien von Oligodendrozyten [177]. Um PRG-3-positive Subpopulationen genauer differenzieren zu können, wurde PRG-3 ebenfalls mit NG2 und O4 kolokalisiert. NG2 ist ein Proteoglykan und wird von Progenitor-Oligodendrozyten und astrozytären Vorläuferzellen exprimiert. Die meisten NG2-positiven Zellen werden später in der Entwicklung zu Oligodendrozyten [178]. NG2-exprimierende Zellen bilden ebenfalls enge Kontakte zu Neuronen, bevor die Myelinisierung eingesetzt hat. Die Expression nimmt mit der Reifung der Vorläufer immer weiter ab. Allerdings können auch im adulten Gehirn NG2-positive Zellen gefunden werden [178, 179]. Der Marker O4 wird von unreifen Prä-Oligodendrozyten exprimiert. Er wird erst postnatal exprimiert. Es ist ein Sulfatid und ein Differenzierungsmarker auf der Zelloberfläche von unreifen Oligodendrozyten [180].

Im Corpus callosum, Fornix, in der Commissura anterior und posterior konnte PRG-3 in einer Subpopulation von CNPase-positiven Oligodendrozyten eindeutig detektiert werden (Abbildung 4.25 C). Mit den Markern NG2 und O4 konnte keine Kolokalisation entdeckt werden (Abbildung 4.25 A und B). Daraus ist zu folgern, dass PRG-3 vornehmlich von reifen Oligodendrozyten exprimiert wird.



Abbildung 4.25: Exemplarische konfokale Darstellung der Doppelimmunfluoreszenz von PRG-3 mit den Oligodendrozytenmarkern NG2, O4 und CNPase im Fornix (axiale Schichten, Stadium P15). In A ist die Kolokalisation von PRG-3 mit NG2, in B mit O4 und in C mit CNPase dargestellt. Die weißen Pfeile weisen in A und B auf jeweils positive PRG-3, NG2 bzw. O4 Oligodendrozyten, die in der Überlagerung rechts nicht kolokalisiert sind. In C weisen die weißen Pfeile auf die positive Überlagerung von PRG-3 mit CNPase. Maßstabsbalken: A 5 μm, B 5 μm, C 5 μm

4.11 Die ultrastrukturelle Lokalisation von PRG-3 im Hippocampus

Zur genaueren Lokalisation des gepunkteten Verteilungsmusters von PRG-3 in Neuronen und ihren Fortsätzen wurde die Elektronenmikroskopie eingesetzt. Dazu wurde die DAB-Immunhistochemie für elektronenmikroskopische Untersuchungen aufbereitet (siehe Kapitel 3.2.5). Die elektronenmikroskopischen Analysen im Gyrus dentatus ergaben, dass das Immunprodukt von PRG-3 in intrazellulären Membranstrukturen, wie z.B. dem endoplasmatischen Retikulum und in der Zellmembran der Körnerzellen lokalisiert war (Abbildung 4.26 B und C).



Abbildung 4.26: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der DAB-Immunhistochemie von PRG-3 im Gyrus dentatus des Hippocampus (axiale Schichten, Stadium P15). In der Übersichtsaufnahme der DAB-Immunhistochemie (A) ist das Areal, das für die Elektronenmikroskopie aufbereitet wurde, markiert. In der elektronenmikroskopischen Vergrößerung ist mit blauen Pfeilen das Immunprodukt von PRG-3 gekennzeichnet (A und B). In A ist das PRG-3-Immunprodukt im rauhen endoplasmatischen Retikulum (rER) mit blauen Pfeilen gekennzeichnet. In C weisen die blauen Pfeile auf gebündelte Signale in intrazellulären Membransystemen, z.B. dem rER. In D wird eine Abbildung dargestellt, die kein Immunprodukt zeigt. M Mitochondrium, N Nucleus, ER endoplasmatisches Retikulum, DG Gyrus dentatus, CA3 Cornu ammonis Region, Hi Hilus, Maßstabsbalken: A 200 µm, B - D 500 nm

4.12 PRG-4-Expression im sich entwickelnden Gehirn der Ratte

Zu PRG-4 existieren bisher keine veröffentlichten Daten zur Expression *in vivo*. In dieser Arbeit wurde erstmalig das Expressionsmuster des PRG-4-Proteins während der Entwicklung im Gehirn der Ratte *in vivo* erforscht. Analog zu den Analysen von PRG-3 wurde mit Hilfe des polyklonalen PRG-4-Antikörpers PRG-4 in embryonalen und postnatalen Entwicklungsstadien im Immunblot und in der DAB-Immunhistochemie untersucht.

Das Immunprodukt von PRG-4 wurde im Immunblot vom Embryonalstadium E13 bis zum Stadium P60 in Totalproteinlysaten aus Rattengehirnen analysiert. Ein erstes schwaches PRG-4-Signal wurde ab dem Stadium E16 detektiert. Die Expression erreichte um den 15. postnatalen Tag einen Höhepunkt und fiel dann diskret bis zum Stadium P60 wieder ab (Abbildung 4.27).



Abbildung 4.27.: Immunblot, der mit jeweils 20 μg Totalproteinlysaten aus Rattengehirnen der Entwicklungsstadien: E13, E14, E15, E16, E17, E18, E19, E20, E21, P0, P5, P10, P15, P20, P30 und P60 beladen wurde (nicht beinhaltet sind der Hirnstamm und der Bulbus olfactorius). Das endogene PRG-4-Protein ist auf Höhe von ca. 40 kDa, nachgewiesen durch den PRG-4-Antikörper, mit dem schwarzen Pfeil gekennzeichnet (A). Als Ladungskontrolle wurde β-Actin verwendet (B). Molekulargewicht in kDa (Prestained Protein Marker, New England Biolabs)

In der DAB-Immunhistochemie wurde das Immunprodukt von PRG-4 im Kortex in späten embryonalen, in postnatalen und adulten Stadien in der Abbildung 4.28 demonstriert. Das PRG-4-Immunprodukt war erst spätembryonal im Stadium E18 schwach in der Marginalzone, in der kortikalen Platte und intermediären Zone zu identifizieren (Abbildung 4.28, E18). Die Expression stieg dann ab dem Stadium P0 stark an. In den frühen und späten postnatalen Stadien wurde PRG-4 stark in den kortikalen Schichten II bis VI exprimiert. In der molekularen Schicht I war kein PRG-4-Produkt zu finden (Abbildung 4.28, P0 bis P30).



Abbildung 4.28.: Dargestellt ist die PRG-4-Expression im sich entwickelnden Kortex in einer kleinen Vergrößerung (axiale Schichten, Wistarratte) der Stadien E18, P0, P5, P10, P15 und P30. Im Stadium P30 wurden die sechs Schichten des Kortex mit I bis VI beschriftet. Im Stadium E18 wurden die MZ Marginalzone, CP kortikale Platte, SP Subplatte, IZ Intermediärzone und SVZ subventrikuläre Zone beschriftet. Maßstabsbalken: 250 µm

In Übersichtsaufnahmen des Hippocampus zeigte sich ab dem Entwicklungsstadium E21 ein erstes positives PRG-4-Signal in den Körnerzellen des Gyrus dentatus und in den Pyramidenzellen der CA-Region (Abbildung 4.29). Ein Maximum der Expression lag zwischen dem 15. bis 25. postnatalen Tag. Danach fiel die Intensität diskret wieder ab (Abbildung 4.29).



Abbildung 4.29: Dargestellt ist die PRG-4-Expression im Hippocampus (axiale Schichten, Wistarratte) mittels DAB-Immunhistochemie in den Entwicklungsstadien E18, E21, P0, P5, P10, P15 und P30. CA1 und CA3 Cornu ammonis-Region, DG Gyrus dentatus, Hi Hilus, neg. K. negative Kontrolle (Stadium P15), Maßstabsbalken: 250 µm

In pränatalen Entwicklungsstadien war kein PRG-4-Immunprodukt im Cerebellum zu detektieren, deshalb wurde PRG-4 im Cerebellum erst ab dem Entwicklungsstadium P0 untersucht. In einer geringen Vergrößerung zeigte sich ab den Stadium P0 ein erstes PRG-4-Signal in den jungen Körnerzellen (Abbildung 4.30, P0). Ab dem Stadium P5 konnte die typische Architektur des Cerebellums mit der Molekularschicht, Purkinjezellschicht und der Körnerzellschicht erfasst werden (Abbildung 4.30, P5). Die Intensität der Färbung blieb während der postnatalen Entwicklung bis zum Stadium P30 konstant.



Abbildung 4.30: Dargestellt ist die PRG-4-Expression im Cerebellum (axiale Schichten, Wistarratte) mittels DAB-Immunhistochemie in den Entwicklungsstadien E18, E21, P0, P5, P10, P15 und P30. DN tiefe Kerngebiete, ML Molekularschicht, PCL Purkinjezellschicht, GCL Körnerzellschicht, neg. K. negative Kontrolle (Stadium P15), Maßstabsbalken: 250 µm

4.12.1 Analyse des feinmorphologischen Expressionsmusters von PRG-4

In einer höheren Vergrößerung von axialen Schnitten des Kortex war zu erkennen, dass PRG-4 im spätembryonalen Stadium E18 moderat in der Subplatte und schwach in der kortikalen Platte zu detektieren war (Abbildung 4.31, E18). Schließlich ließen sich ab dem Stadium P0 deutlich Neurone und ihre Dendriten vor allem in den Kortexschichten II bis VI abgrenzen (Abbildung 4.31, P0). Während der weiteren postnatalen Entwicklung persistierte eine starke Intensität des PRG-4-Immunprodukts vor allem in den Pyramidenzellen der Schichten III, V und VI.

Im Gegensatz zu PRG-3 war die Intensität des PRG-4-Signals in den Dendriten der Neurone deutlich stärker ausgeprägt. PRG-4 konnte nicht nur im proximalen Part der Dendriten, sondern in ihrer gesamten Länge identifiziert werden (Abbildung 4.31, P5 bis P30).



Abbildung 4.31: Expression von PRG-4 im sich entwickelnden Kortex in den Stadien E18, P0, P5, P10, P15 und P30 (axiale Schichten, Wistarratte) in einer höheren Vergrößerung. Die schwarzen Pfeile in den Abbildungen P5, P10, P15 und P30 weisen auf Dendriten. CP kortikale Platte, SP Subplatte, IZ Intermediärzone, I-VI Schichtung im Kortex. Neg. K. negative Kontrolle (Stadium P10), Maßstabsbalken: 50 μm

Im pränatalen Stadium E18 war PRG-4 im Hippocampus in höheren Vergrößerungen in der subventrikulären Zone und der hippocampalen Platte dezent zu identifizieren. In der Area dentata zeigte sich ebenfalls ein nur diskretes positives PRG-4-Signal (Abbildung 4.32, E18). Jedoch kam es direkt postnatal zu einer deutlichen Zunahme der neuronalen Expression im Cornu ammonis und Gyrus dentatus des Hippocampus (Abbildung 4.32, P0). Die genauere Analyse des feinmorphologischen Expressionsmusters in den postnatalen Entwicklungsstadien ergab eine starke Expression von PRG-4 in den Pyramidenzellen und ihren Dendriten der CA-Region (Abbildung 4.32, P5 bis P30). Des Weiteren zeigte sich auch in der gesamten

hippocampalen Formation, dass PRG-4 relativ konstant während der postnatalen Entwicklung präsent war (Abbildung 4.32, P5 bis P30).



Abbildung 4.32: Expression von PRG-4 im sich entwickelnden Hippocampus in den Stadien E18, P0, P5, P10, P15 und P30 (axiale Schichten, Wistarratte). Im Hippocampus wird als repräsentatives Beispiel die CA1-Region des Cornu ammonis dargestellt. Die schwarzen Pfeile weisen auf Dendriten der Pyramidenzellen. Str. rad. Stratum radiatum, DG Gyrus dentatus, Hi Hilus, HP hippocampale Platte mit CA1- und CA3-Region, IZ Intermediärzone, AD Area dentata, neg. K. negative Kontrolle (Stadium P5), Maßstabsbalken: 50 µm

Im Cerebellum war PRG-4 im Stadium P0 lediglich in jungen Körnerzellen und den Neuronen der tiefen Kerngebiete zu erfassen (Abbildung 4.33, P0). Dabei fiel auf, dass PRG-4 demnach vornehmlich in der äußeren Körnerzellschicht zu finden war. In diesem Bereich befindet sich während der frühen postnatalen Entwicklung des Cerebellums eine zweite Keimzone, aus der junge Körnerzellen in die innere Körnerzellschicht migrieren [45]. Ab dem Stadium P5 konnten Purkinjezellen erstmalig schwach identifiziert werden (Abbildung 4.33, P5, blaue Pfeile). Ab

dem Stadium P10 waren die Purkinjezellen dann mit ihrem ausgeprägten Dendritenbaum und die Körnerzellen intensiv PRG-4-immunreaktiv (Abbildung 4.33, P10). Die Intensität der Färbung persistierte bis zum Stadium P30 (Abbildung 4.33, P30).



Abbildung 4.33: PRG-4-Expression im Cerebellum (axiale Schichten, Wistarratte) in den Entwicklungsstadien P0, P5, P10, P15 und P30. ML Molekularschicht, PCL Purkinjezellschicht, GCL Körnerzellschicht, iGCL innere Körnerzellschicht, eGCL äußere Körnerzellschicht, neg. K. negative Kontrolle (Stadium P15). Die Purkinjezellen sind mit blauen Pfeilen markiert. Die Dendriten der Purkinjezellen sind mit schwarzen Pfeilen markiert. Neg. K. negative Kontrolle (Stadium P15), Maßstabsbalken: 50 µm

4.12.2 Immunhistochemische Verteilung von PRG-4 im postnatalen Rattengehirn

Mittels der DAB-Immunhistochemie wurde das Verteilungsmuster von PRG-4 im gesamten Gehirn von Wistarratten in den Entwicklungsstadien von P0 bis P30 untersucht (Tabelle 4.5). Ähnlich wie PRG-3 wurde auch PRG-4 in nahezu jeder untersuchten Region von Neuronen exprimiert. Im Gegensatz zu PRG-3 fand sich jedoch kaum eine Dynamik der Signalintensität während der postnatalen Entwicklung. PRG-4 war relativ konstant in den Neuronen aller Regionen zu finden. Allerdings stieg die Signalintensität zum Zeitpunkt der Geburt plötzlich an. Eine besonders starke Expression in Neuronen zeigte sich in den Schichten II bis VI des Kortex, im Thalamus, in den Pyramidenzellen der CA-Region, in den Körnerzellen des Gyrus dentatus und in den Purkinjezellen und Körnerzellen im Cerebellum (Tabelle 4.5). PRG-4 wurde speziell von Projektionsneuronen und einigen Interneuronen exprimiert.

Region	P0	P5	P10	P15	P30					
Kortex										
Neokortex: Frontal-, Parietal-, Te	emporal-, Occ	ipitalkortex								
Kortexschicht I	+	+	+	+	+					
Kortexschicht II	2 ++++	2 ++++	3 +++	3 +++	3 +++					
Kortexschicht III	2 +++	3 +++	3 +++	3 +++	3 +++					
Kortexschicht IV,V	2 +++	3 +++	3 ++	3 +++	3 +++					
Kortexschicht VI	2 +++	3 ++++	3 +++	3 +++	3 +++					
Gyrus cinguli	2 +++	3 +++	3 +++	3 +++	3 +++					
Bulbus olfactorius	2 ++	3 +++	3 +++	3 +++	3 +++					
Corpus callosum	+	+	++	++	++					
Commissura anterior	+	+	++	++	++					
Striatum (Ncl. Caudatus,	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++					
Putamen)										
Globus pallidus	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++					
Nucleus accumbens	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++					
Teania tecta	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++					
Septum										
Nucleus septohippocampalis	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++					
Nucleus septalis lateralis	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++					
Nucleus septalis medialis	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++					
Nucleus septofimbrialis	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++					
Nucleus septalis triangularis	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++					
Subfornicales Organ	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++					
Thalamus										
Nucleus reuniens	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++					
Nucleus reticularis	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++					
Nucleus ventralis	2 +++	2 +++	2 +++	2 +++	2 +++					

posteriomedialis					
Nucleus ventralis	2 +++	2 +++	2 +++	2 +++	2 +++
posteriolateralis					
Nucleus posteriolateralis	2 +++	2 +++	2 +++	2 +++	2 +++
Nucleus laterodorsalis	2 +++	2 +++	2 +++	2 +++	2 +++
Nucleus intermediodorsalis	2 +++	2 +++	2 +++	2 +++	2 +++
Posteriore thalamische	2 +++	2 +++	2 ++	2 ++	2 ++
Kerngruppe					
Nucleus rhomboideus	2 +++	2 +++	2 ++	2 ++	2 ++
Nucleus submedius	2 +++	2 +++	2 ++	2 ++	2 ++
Nucleus anteroventralis	2 +++	2 +++	2 ++	2 ++	2 ++
Nucleus subthalamicus	2 +++	2 +++	2++	2++	2 ++
Stria terminalis	+	+	+	+	+

Hippocampus					
Ammonshorn: CA1- CA3					
Stratum oriens	1 +	1 +	1 +	1 +	1 +
Stratum pyramidale	2 +++	2 ++++	3 ++++	3 ++++	3 +++
Stratum radiatum	1 +	1 +	1 +	1 +	1 +
Gyrus dentatus:					
Körnerzellschicht	2 ++++	2 ++++	3 ++++	3 ++++	3 +++
Molekularschicht	1 +	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++
Hilus	2 +++	2 +++	3 +++	3 +++	3 +++
Fimbria hippocampus	1 +	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++
Amygdalohippocampales Areal	2 +++	2 +++	3++	3 ++	2 ++
Subiculum	2 +++	2 +++	3 +++	3 +++	3 +++
Parasubiculum	2 +++	3 +++	3 +++	3 +++	3 +++
Presubiculum	2 +++	3 +++	3 +++	3 +++	3 +++
Alveus	+	++	++	++	++

Diencephalon									
Nucleus habenularis medialis	2 +++	2 +++	2 +++	2 +++	2 +++				
laterale Habenula	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++				
mediale Habenula	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++				
Commissura posterior	+	+	++	++	++				

Hypothalamus						
Nucleus posterior	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++	
Area hypothalamicus anterior	2 ++	2 ++	2++	2 ++	2 ++	

Mesencephalon, Pons und Medulla oblongata					
Nucleus geniculatum laterale	2 +++	2 +++	2 ++	2 ++	2 ++
Nucleus geniculatum medialis	2 +++	2 +++	2 +++	2 +++	2 +++
Nuclei pontis	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++	2 +
Nucleus reticularis	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++	2 +
Nucleus raphe medianus	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++
Substantia nigra, Pars compacta	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++	2 +
Substantia nigra, Pars reticularis	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++	2 +
Nucleus ruber	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++

Nucleus pararubralis	2 +++	2 ++	2 ++	2 ++	2++
Nucleus dorsoventralis des	2 +++	2 +++	2 +++	2 +++	2 ++
Lemniskus lateralis					
Zentrales Grau	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++	2 +
Nucleus laterodorsalis	2 +++	2 +++	2 +++	2 +++	2 +++
tegmentalis					
Decussatio pedunculorum	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++
cerebellarium superiorum					
Nucleus mesencephalicus	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++
Nucleus trochlearis	2 ++	2 ++	2 +++	2 +++	2 +++
Nucleus principalis oculomotorii	2 ++	2 ++	2 +++	2 +++	2 +++
Nucleus cerebellaris medialis	2 +++	2 +++	2 +++	2 +++	2 +++
Periaqueductales Grau	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++
Nucleus centralis des Colliculus	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++	2 ++
inferior					
Nucleus mesencephalicus	2 ++	2 ++	2 +++	2 +++	2 ++
trigemini					

Cerebellum					
Körnerzellschicht	2 ++	2 +++	2 +++	2 +++	2 +++
Purkinjezellschicht	1 +	1 ++	3 ++	3 +++	3 +++
Molekularschicht	+	+	+	+	+
Tiefe Kerngebiete	2 ++	2 +++	2 +++	2 +++	2 +++

Tabelle 4.5: Tabellarische Darstellung der Expression von PRG-4 im sich entwickelnden postnatalen Gehirn der Ratte. + schwaches PRG-4-Signal, ++ moderates PRG-4-Signal, +++ starkes PRG-4-Signal, ++++ sehr starkes PRG-4-Signal in Neuronen und Oligodendrozyten in Fasertrakten. 1 schwaches PRG-4-Signal, 2 moderates PRG-4-Signal, starkes PRG-4-Signal in den Dendriten. Pro Entwicklungsstadium wurden n= 5 Tiere verwendet.

4.13 PRG-4-Expression in Interneuronen

Die Analyse des Expressionsmusters von PRG-4 beinhaltete ebenfalls eine Unterscheidung der verschiedenen Zelltypen und Subpopulationen von Neuronen. Dazu wurde PRG-4 analog zu PRG-3 mit den Markern für Interneurone Parvalbumin, Calbindin und Calretinin in Doppelimmunfluoreszenzanalysen kolokalisiert.

Diese Untersuchungen ergaben, dass PRG-4 im Hippocampus in nahezu allen Interneuronen, die Parvalbumin, Calbindin bzw. Calretinin immunreaktiv waren, auch lokalisiert war (Abbildung 4.34). Im Gegensatz zu PRG-3 ließen sich die Dendriten der Interneurone auch mit dem PRG-4-Antikörper visualisieren (Abbildung 4.34 A und B, gelbe Pfeile).



Abbildung 4.34: Exemplarische konfokale Aufnahmen von Immunfluoreszenzdoppelfärbungen im Hippocampus (axiale Schichten, Stadium P15). In A ist das PRG-4-Protein mit Parvalbumin (Parv) in der CA1-Region kolokalisiert. In B ist PRG-4 mit Calretinin im Stratum radiatum (Str. rad.) in der CA3-Region kolokalisiert. In C ist PRG-4 mit Calbindin in der CA1-Region dargestellt. Die weißen Pfeile weisen auf die kolokalisierten Interneurone. Die gelben Pfeile (A und B) weisen auf Dendriten der Neurone, die auch PRG-4-immunreaktiv sind. In C sind rechts oben als Beispiel Färbungen ohne Primärantikörper als negative Kontrolle dargestellt. Maßstabsbalken: A 50 µm, B 25 µm, C 10 µm

Im Kortex war das Immunprodukt von PRG-4 in Parvalbumin-, Calbindin- und Calretininpositiven Interneurone ebenfalls kolokalisierbar (Abbildung 4.35). Im Vergleich zu den PRG-4positiven Interneuronen im Hippocampus war die Signalintensität jedoch deutlich schwächer und nicht alle Interneurone, die Parvalbumin, Calbindin oder Calretinin exprimierten, waren PRG-4positiv (Abbildung 4.35 A – C). Durch die schwächere Färbung dieser Interneurone mit dem PRG-4-Antikörper waren die Dendriten dieser Interneurone kaum zu erkennen (Abbildung 4.35 A – C).



Abbildung 4.35: Beispielhafte konfokale Aufnahmen einer Doppelimmunfluoreszenz von PRG-4 mit den Interneuronmarkern im Kortex (axiale Schichten, Stadium P15). In A PRG-4 mit Parvalbumin (Parv). In B ist PRG-4 mit Calbindin und in C mit Calretinin kolokalisiert. Die weißen Pfeile verweisen auf die kolokalisierten Interneurone. Die gelben Pfeile weisen bei PRG-4 auf Dendriten und bei den Interneuronmarkern auf Axone der Neurone. Maßstabsbalken: A 10 µm, B 25 µm, C 10 µm

4.14 PRG-4-Expression im Cerebellum

PRG-4 wurde in den Purkinjezellen, Körnerzellen sowie Interneuronen des Cerebellums in der DAB-Immunhistochemie stark identifiziert. Die Zellsomata und der Dendritenbaum der Purkinjezellen waren besonders intensiv zu erkennen. Infolgedessen konnte der ausgeprägte Dendritenbaum der Purkinjezellen auch in den Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von PRG-4 mit Parvalbumin und Calbindin anschaulich demonstriert werden (Abbildung 4.36 A und B). Darüber hinaus war PRG-4 auch in Calretinin-positiven Interneuronen vorzufinden (Abbildung 4.36 C).



Abbildung 4.36: Beispielhafte konfokale Aufnahmen einer Doppelimmunfluoreszenz von PRG-4 im Cerebellum, kolokalisiert mit den Markern Calbindin, Calretinin und Parvalbumin (axiale Schichten, P15). In A wurde PRG-4 mit Parvalbumin (Parv) in Purkinjezellen (weiße Pfeile) kolokalisiert. In B wird auf den Dendritenbaum einer Purkinjezelle fokussiert (gelbe Pfeile). In C weist der weiße Pfeil auf ein Interneuron in der Körnerzellschicht (GCL), das PRG-4 und Calretinin exprimiert. Maßstabsbalken: A 10 μm, B 10 μm, C 20 μm

4.15 PRG-4 wird stark in Dendriten exprimiert

In der DAB-Immunhistochemie fiel auf, dass PRG-4 stark dendritisch lokalisiert ist. Es konnte übereinstimmend eine eindeutige Kolokalisation von PRG-4 mit dem etablierten Marker für Dendriten MAP2 in den untersuchten Regionen Kortex, Hippocampus und Cerebellum gefunden werden (Abbildung 4.37). Dabei fiel auf, dass PRG-4 im Gegensatz zu PRG-3 in Dendriten in ihrer gesamten Länge detektierbar war.


Abbildung 4.37: Exemplarische konfokale Aufnahmen einer Doppelimmunfluoreszenz von PRG-4 im Cornu ammonis des Hippocampus (A) und im Kortex (B) kolokalisiert mit dem mikrotubuli-assoziierten Dendritenmarker MAP2 (axiale Schichten, Stadium P15). Die weißen Pfeile verweisen auf die Dendriten der Pyramidenzellen in der CA1-Region (CA1) und der Pyramidenzellen im Kortex (Schicht IV und V). Str. rad. Stratum radiatum, Maßstabsbalken: A und B 50 µm

4.16 PRG-4 ist nicht axonal lokalisiert

Bisher wurde ausschließlich die starke Expression von PRG-4 in Dendriten dargelegt. Es wurde jedoch ebenfalls untersucht, ob PRG-4 sich auch mit axonalen Markern, wie Tau1 und Neurofilament kolokalisieren ließ, um damit zu zeigen, ob PRG-4 auch axonal lokalisiert ist. Bei diesen Doppelimmunfluoreszenzuntersuchungen wurde PRG-4 nicht mit Tau1 in den Axonen, die vom Entorhinalkortex über die Molekularschicht des Gyrus dentatus mit den Körnerzellen interagieren, detektiert (Abbildung 4.38 A). Darüber hinaus wurde auch keine Überlagerung von PRG-4 mit Tau1 in der Molekularschicht des Cerebellums gefunden. Tau1 markierte Kletter-und Parallelfasern, während PRG-4 nur in den Dendriten der Purkinjezellen lokalisiert war (Abbildung 4.38 B). Es imponierte das PRG-4-Immunprodukt zwischen den axonalen Strukturen, also genau in den Bereichen, die nicht mit den axonalen Markern gefärbt waren. Demnach konnte PRG-4 nicht mit Tau1 und Neurofilament kolokalisiert werden.



Abbildung 4.38: Exemplarische konfokale Aufnahmen einer Doppelimmunfluoreszenz von PRG-4 im Gyrus dentatus und im Cerebellum (axiale Schichten, Stadium P15) mit dem mikrotubuli-assoziierten Protein, Tau1 und dem Neurofilament (NF, schwere Untereinheit). In A verweisen die gelben Pfeile auf ein mit Tau1 visualisiertes Axon einer Körnerzelle (GCL), das nicht PRG-4-immunreaktiv ist (weiße Pfeile). In B wird der Dendritenbaum einer Purkinjezelle (PCL) mit weißen Pfeilen erfasst. Die gelben Pfeile weisen auf das Tau1-Signal, das Kletterfasern, die Kontakte mit den Dendriten der Purkinjezelle bilden, zeigt. In C zeigt sich, dass PRG-4 in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus nicht mit dem Neurofilament kolokalisiert ist. GCL Körnerzellschicht, ML Molekularschicht, iml innere Molekularschicht, Maßstabsbalken: A 10 μm, B 5 μm, C 5 μm

4.17 PRG-4 ist nicht präsynaptisch lokalisiert

Das gepunktete Verteilungsmuster von PRG-4 im Bereich von Dendriten sollte in Doppelimmunfluoreszenzuntersuchungen mit Calbindin im Stratum lucidum der CA3-Region des Hippocampus und mit den präsynaptischen Markern Synaptophysin, VGLUT 1, und VGAT genauer untersucht werden, ob eine präsynaptische Lokalisation von PRG-4 vorliegt.



Abbildung 4.39: Konfokale Aufnahmen einer Doppelimmunfluoreszenz von PRG-4 im Gyrus dentatus (DG) und in der Molekularschicht (ML) im Cerebellum (axiale Schichten, Stadium P15) mit den präsynaptischen Markern Synaptophysin, VGat und VGlut 1. In A und B weisen die weißen Pfeile auf präsynaptische Strukturen in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus, die nicht PRG-4-immunreaktiv sind. In C wird mit den weißen Pfeilen auf präsynaptische Strukturen der Kletterfasern, die die Dendriten umgeben und nicht mit PRG-4 kolokalisiert werden können. GCL Körnerzellschicht, PCL Purkinjezellschicht, ML Molekularschicht, Maßstabsbalken: A 5 µm, B 15 µm C 5 µm

In diesen Analysen zeigte sich, dass das gepunktete PRG-4-Signal bei der Überlagerung immer genau neben den Markern lokalisiert war. Es konnte eine Kolokalisation identifiziert werden (Abbildung 4.39).

4.18 PRG-4-Expression in Gliazellen

Es wurde weiterhin untersucht, ob PRG-4 von Gliazellen exprimiert wird. Dazu wurden Doppelimmunfluoreszenzanalysen mit dem Marker für Astrozyten, GFAP, mit einem Marker für Mikroglia, IB4, und mit drei Markern für Oligodendrozyten durchgeführt. PRG-4 war in den untersuchten Regionen Kortex, Hippocampus und Cerebellum nicht mit GFAP kolokalisiert (Abbildung 4.40, A). Im Gegensatz dazu konnte allerdings ein diskretes Signal von PRG-4 in IB4-positiven Mikroglia in diesen Gehirnregionen detektiert werden (Abbildung 4.40, B).



Abbildung 4.40: Konfokale Aufnahmen einer Doppelimmunfluoreszenz von PRG-4 mit den Astrozytenmarker GFAP und dem Mikrogliamarker IB4 im Hippocampus (axiale Schichten, Stadium P15). Die weißen Pfeile verweisen darauf, dass PRG-4 nicht in Astrozyten (A), aber ganz diskret in Mikroglia (B) exprimiert wird. Maßstabsbalken: A 50 µm, B 10 µm

PRG-4 wurde ebenfalls mit drei Oligodendrozytenmarkern, die verschiedene Reifestadien von Oligodendrozyten markieren, im Corpus callosum, Fornix, in der Commissura anterior und posterior analysiert (Abbildung 4.41). Abweichend zu PRG-3 war PRG-4 in allen Reifestadien von Oligodendrozyten aufzufinden.



Abbildung 4.41: Exemplarische konfokale Darstellung der Doppelimmunfluoreszenz von PRG-4 mit den Oligodendrozytenmarkern NG2, O4 und CNPase im Alveus des Hippocampus (A und C) und im Balken (B) (axiale Schichten, P15). In A ist die Kolokalisation von PRG-4 mit dem Marker NG2 für Progenitorzellen der Oligodendrozyten, in B mit dem Marker für Prä-Oligodendrozyten O4 und in C mit dem Marker CNPase für alle Oligodendrozyten dargestellt. Maßstabsbalken: A 5 µm, B 5 µm, C 5 µm

4.19 Die ultrastrukturelle Lokalisation von PRG-4 im Hippocampus

Das intrazelluläre Verteilungsmuster von PRG-4 wurde mittels Elektronenmikroskopie ultrastrukturell untersucht. Die DAB-Immunhistochemie wurde hierzu aufbereitet. Es wurden der Gyrus dentatus gewählt, der eine starke Expression von PRG-4 aufweist. Im Gyrus dentatus wurde das PRG-4-Immunprodukt in den Körnerzellen und ihren Dendriten gefunden. Ultrastrukturell konnte intrazellulär deutlich ein aggregiertes Immunprodukt entlang von Membranstrukturen abgegrenzt werden (Abbildung 4.42 B, blaue Pfeile). Das DAB-Produkt war deutlich im endoplasmatischen Retikulum und in der Zellmembran nachweisbar (Abbildung 4.42 B).



Abbildung 4.42: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der DAB-Immunhistochemie von PRG-4 im Hippocampus (axiale Schichten, Stadium P15). In der Übersichtsaufnahme der DAB-Immunhistochemie (A) das Areal, das für die Elektronenmikroskopie aufbereitet wurde, markiert. In ist der elektronenmikroskopischen Vergrößerung ist mit blauen Pfeilen das DAB-Immunprodukt von PRG-4 gekennzeichnet (B). Das PRG-4-DAB-Immunprodukt ist im rauhen endoplasmatischen Retikulum (rER) dargestellt. In C wird eine Abbildung dargestellt, die kaum ein PRG-4-DAB-Immunprodukt zeigt. M Mitochondrium, N Nucleus, ER endoplasmatisches Retikulum, DG Gyrus dentatus, CA3 Cornu ammonis Region, Hi Hilus, Maßstabsbalken: A 200 µm, B 1 µm, C 500 nm

5. Diskussion

Die Entwicklung und korrekte Funktion des ZNS werden durch zahlreiche, zum Teil noch unverstandene molekulare Regulationsmechanismen kontrolliert. Das ZNS ist in der Lage funktionelle und morphologische Störungen teilweise zu kompensieren und sich je nach Ausmaß und Lokalisation einer Schädigung zu regenerieren. Die molekularen Mechanismen der Entwicklung und Plastizität des ZNS sind von außerordentlichem wissenschaftlichem das Ziel sein mit zunehmendem Interesse. da es muss Verständnis dieser Regulationsmechanismen kausale Therapieansätze sowohl für Störungen der Entwicklung als auch für Regenerationsprozesse nach Schädigung des ZNS zu entwickeln. Weltweit beschäftigt sich eine Vielzahl von Forschergruppen mit der Analyse von den verschiedensten intrinsischen und extrinsischen Faktoren, die diese Prozesse kontrollieren oder zumindest beeinflussen können. In den letzten Jahren rückten die LPPs und ihre Substrate durch ihre Einflussnahme in Prozesse u.a. der Wundheilung, Tumorgenese, Angiogenese und insbesondere der Gehirnentwicklung vermehrt in den wissenschaftlichen Mittelpunkt [92, 97, 108, 115 - 123].

Das von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Nitsch in einem *Screening Assay* von *sprouting*relevanten Proteinen entdeckte PRG-1 wird gehirnspezifisch exprimiert, während der Entwicklung reguliert und nach einer Entorhinalkortexläsion hochreguliert [141]. Die vier weiteren Mitglieder der Plasticity Related Gene Familie wurden bei Sequenzdatenvergleichen selektiert. Durch erste Daten zu ihrer Gewebespezifität und Regulation während der Entwicklung sowie durch ihre phylogenetische Verwandtschaft zu den LPPs, wuchs auch das Interesse an der Erforschung ihrer Expression, Funktion und Regulation. Bisher existierten für PRG-3 vorwiegend Daten zur Expression des Proteins aus *in vitro* Untersuchungen und zur Expression der mRNA mittels quantitativer Real-time RT-PCR und *In-situ*-Hybridisierung [144, 145, 152, 159]. Zu PRG-4 existieren nur unveröffentlichte Daten zur mRNA-Expression im Gehirn der Ratte. Der Zweck dieser Arbeit bestand darin, das Expressionsmuster von PRG-3 und PRG-4 im sich entwickelnden Gehirn der Ratte auf Proteinebene *in vivo* zu untersuchen.

5.1 Die polyklonalen Antikörper gegen PRG-3 und PRG-4 sind spezifisch

Zur Analyse des Expressionsmusters von PRG-3 und PRG-4 auf Proteinebene mussten zuerst spezifische Antikörper generiert werden, da es während der Durchführung dieser Arbeit keine kommerziellen Antikörper gab. Die Antikörper sollten sowohl in der Immunhistochemie auf Gehirngewebe, in der Immunzytochemie auf Zellen als auch im Immunblot repräsentative

und reproduzierbare Ergebnisse zeigen. Das zu erkennende Peptid sollte in einer für das Protein einmaligen Region liegen, um unspezifische Bindungen zu vermeiden.

5.1.1 Generierung von polyklonalen Antikörpern

Für PRG-3 und PRG-4 wurden jeweils insgesamt vier verschiedene Peptidsequenzen ausgewählt, die der Firma BioGenes als Vorlage zur Herstellung von synthetischen Peptiden dienten. Kaninchen, deren Seren vor der Immunisierung mit dem jeweiligen Peptid keine Kreuzreaktionen mit Totalproteinlysaten aus Rattengehirnen im Immunblot vorwiesen, wurden für die Generierung der Antikörper ausgewählt. Auf diese Weise konnten die Tiere, deren Seren Antikörper enthielten, die bereits vor der Immunisierung Antigene in Totalproteinlysaten aus Rattengehirnen erkannten, ausgeschlossen werden. Aus den getesteten Antiseren wurden schließlich diese ausgewählt, die die gewünschten o.g. Kriterien am besten erfüllten. Die Synthese der Peptide und die Immunisierung der Tiere wurden bewusst an eine erfahrene Firma übertragen, um optimale Antikörper zu erhalten. Obwohl beide in der Folge verwendeten Antikörper für PRG-3 und PRG-4 polyklonal waren, detektierten sie saubere Banden im Immunblot und zeigten ein spezifisches Färbemuster in der Immunhistochemie. Aus den vorgenannten Gründen und der nur gering verfügbaren Mengen der Antikörper wurde auf eine Affinitätsaufreinigung verzichtet. Nachteilig ergab sich dafür, dass beide nicht aufgereinigte Antikörper eine stärkere Hintergrundfärbung im Immunblot und in der Immunhistochemie hervorriefen.

Für PRG-3 wurde letztendlich ein Antikörper ausgewählt, der in der Spezies Ratte gegen das Peptid C-KGTQGSASKPKPED im intrazellulären C- Terminus gerichtet ist (Abbildung 4.1). Für PRG-4 wurde ebenfalls ein Antikörper gewählt, der gegen das Peptid C-RIRHRHGSPHPSRRT im intrazellulären C-Terminus gerichtet ist (Abbildung 4.3).

5.1.2 Spezifität der Antikörper

5.1.2.1 Beide Antikörper erkennen ihr Bindungspeptid

In einem Spezifitätstest wurde sowohl im Immunblot als auch in der Immunhistochemie für beide Antikörper bewiesen, dass sie ihr Peptid spezifisch erkennen. Die Antikörper konnten durch vorherige Inkubation mit ihrem im Überschuss verwendeten Bindungspeptid gesättigt werden. Die anschließende Inkubation der Antikörper mit den Immunblots bzw. dem Gehirngewebe ergab, dass kein bzw. ein sehr viel schwächeres Signal zu detektieren war. Eine parallele Inkubation der Antikörper mit BSA als Kontrollpeptid hatte keinen Einfluss auf die Signalintensität im Immunblot bzw. auf das Färbemuster in der Immunhistochemie. Diese Testung bewies, dass beide Antikörper ihre Peptide spezifisch erkennen und BSA nicht als Peptid binden (Abbildungen 4.5 bis 4.8).

5.1.2.2 Anwendbarkeit der Antikörper

Zur weiteren Analyse der Spezifität der beiden Antikörper und ihrer Nutzbarkeit wurden diese eingesetzt, um rekombinante Proteine aus Zelllinien aufzureinigen. Dabei wurde das jeweilige rekombinante Protein aus COS-7-Zellen mit zwei Methoden zur Proteinisolierung gewonnen. Die jeweiligen Proteine PRG-3-eGFP bzw. PRG-4-eGFP wurden anschließend mit den Antikörpern gegen PRG-3 bzw. PRG-4 im Immunblot nachgewiesen.

Die Immunpräzipitationsmethode wurde zusätzlich genutzt, um zu demonstrieren, ob die Antikörper gegen PRG-3 bzw. PRG-4 genutzt werden können, um rekombinante Proteine aus Zellen zu isolieren. Mit dem PRG-3-Antikörper konnte das rekombinante PRG-3-Protein aus COS-7-Zellen gewonnen werden. Mit dem PRG-4-Antikörper konnte das rekombinante PRG-4-Protein nicht isoliert werden. Im Endeffekt resultierte aus den Ergebnissen der Isolierung des PRG-3-eGFP-Proteins. dass es sich mit dem PRG-3-Antikörper in der Immunpräzipitationsmethode genauso gut isolieren ließ wie mit dem eGFP-Antikörper oder dem µMacs Kit. Mit dem PRG-4-Antikörper ließ sich das rekombinante Protein nicht sicher mit der Immunpräzipitationsmethode gewinnen. Für beide Antikörper wurde im Rahmen dieser Untersuchung bewiesen, dass weder der PRG-3- noch der PRG-4-Antikörper das eGFP-Protein im Immunblot als ihr Antigen erkannte und dass sich das eGFP-Protein auch nicht mit Hilfe dieser beiden Antikörper aus den zuvor transfizierten COS-7-Zellen gewinnen ließ. Aus diesen Ergebnissen resultierten eine breite Anwendbarkeit und eine hohe Spezifität der Antikörper für ihr jeweiliges Antigen.

5.1.2.3 Erste immunhistochemische Färbungen

Vor der systematischen Analyse des Expressionsmusters beider Proteine während der Entwicklung im Gehirn der Ratte wurden diese mit verschiedenen Detergenzien und Blockierungslösungen getestet, um die Färbung mit der optimalen Spezifität zu ermitteln. Damit sollte analysiert werden, wie stabil die Proteine und Antikörper sind, welche Detergenzien sich am besten für die Antikörper eignen und welchen Einfluss die verschiedenen Detergenzien und Blockierungslösungen auf die Antikörper und PRG-3 bzw. PRG-4 ausüben. Es resultierte, dass beide Antikörper mit den Detergenzien Flüssigstickstoff, Triton X-100 und Saponin ähnlich gut die Zellmembran penetrieren konnten. Zur Minimierung der Hintergrundfärbung eigneten sich FCS und NGS am besten. Ohne vorheriges Permeabilisieren der Zellmembranen ergab sich das Phänomen, dass keine Färbung im mittleren Bereich der Schnitte, die 50 µm dick waren, zu detektieren war. Da beide Antikörper ein Epitop im intrazellulären C-Terminus von PRG-3 bzw. PRG-4 erkennen, war demzufolge ein Detergenz zum Permeabilisieren der Zellmembranen unerlässlich, damit die Antikörper in die Zellen gelangen konnten.

5.2 PRG-3 zeigt eine dynamische Expression während der Gehirnentwicklung der Ratte

Savaskan *et al.* analysierten semiquantitativ mittels *In- situ-* Hybridisierung die mRNA-Expression von PRG-3 während der Entwicklung im Gehirn der Ratte [144]. Es wurde gezeigt, dass die mRNA ab dem Embryonalstadium E16 in der hippocampalen Anlage, im Thalamus, Kortex und Bulbus olfactorius exprimiert wird. Die Signalintensität wurde um den Geburtstermin im Hippocampus und Kortex am höchsten detektiert und fiel dann postnatal kontinuierlich wieder ab [144]. Tanja Velmans hat in ihrer Dissertation gezeigt, dass die quantitative Analyse der mRNA von PRG-3 in der Real-time RT-PCR und die semiquantitative Analyse des PRG-3-Proteins im Immunblot im sich entwickelnden Gehirn der Maus ebenfalls eine entwicklungsabhängige Expression sowohl der mRNA als auch des Proteins ergab [152]. Molnár *et al.* zeigten im Jahr 2005, dass die mRNA von PRG-3 im Gehirn der Maus in der *In-situ*-Hybridisierung bereits ab dem Embryonaltag E14 im Kortex, Thalamus, Epithalamus und in der hippocampalen Anlage exprimiert wird [159].

An diese Vordaten sollte mit dieser Arbeit angeknüpft werden. Die Expression des PRG-3-Proteins wurde wie o.g. bisher im Immunblot nur in der Spezies Maus untersucht. Expressionsanalysen in der Spezies Ratte wurden bisher nur auf mRNA-Ebene durchgeführt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass PRG-3 auf Proteinebene im sich entwickelnden Rattengehirn ebenfalls zeitabhängig exprimiert wird. Im Immunblot reagierte der Antikörper gegen PRG-3 ab dem E13 mit den Totalproteinlysaten. In der Immunhistochemie wurde das PRG-3-Protein ab dem Entwicklungsstadium E17 im Kortex und Hippocampus detektiert. Es kam zu einem starken Anstieg der Signalintensität im Immunblot und in der Immunhistochemie um den Geburtstermin bis zu den frühen postnatalen Stadien. Nach dem Stadium P10 kam es zu einem stetigen Absinken des Signals bis zum Stadium P30. Die Ergebnisse der Immunhistochemie verhalten sich mit den Daten der semiquantitativen *In-situ*-Hybridisierung von Savaskan *et al.* verzögert. Die mRNA wurde einen Tag vor dem Protein detektiert und fiel dann nach dem Stadium P5 wieder ab. Diese diskrete Diskrepanz kann durch posttranskriptionale, translationale Modifikationen und Regulationen und die Degradationsrate der mRNA und des Proteins erklärt werden [182]. Die Expression der mRNA muss nicht immer mit der Proteinexpression streng korrelieren. Eine fehlende Korrelation zwischen der mRNA- und Proteinexpression kann durch eine unterschiedliche Menge der mRNA bzw. des Proteins, durch unterschiedliche Halbwertzeiten, posttranskriptionale und translationale Modifikationen oder durch eine unterschiedliche Degradationsrate beider Moleküle bedingt sein [182, 183].

5.2.1 Expression von PRG-3 im sich entwickelnden Kortex

Es wurde durch Molnár *et al.* demonstriert, dass die mRNA in den frühen postnatalen Stadien P0 bis P6 im Gehirn der Maus einen Gradienten im Kortex aufwies [159]. Es wurde ein intensiveres Signal im dorsalen Kortex im Vergleich zum lateralen Kortex identifiziert. Dieser Gradient verschwand in späteren postnatalen Entwicklungsstadien nach P10, ab dem das PRG-3-Signal homogen im Kortex zu erkennen war. Weiterhin konnte im embryonalen Stadium E15 eine höhere mRNA-Expression in der SVZ und VZ als in der CP und MZ gefunden werden. Dieses Muster änderte sich dann ab dem Stadium E16. Es kam zu einer Verschiebung des Signals in höhere Schichten, in die CP [159]. Darauf basierend schlussfolgerten die Autoren, dass PRG-3 einen Einfluss auf die Kortikogenese haben wird.

Die Ergebnisse der detaillierteren Untersuchung der Verteilung von PRG-3 im sich entwickelnden Rattengehirn mit Hilfe der Immunhistochemie in dieser Arbeit zeigten ebenso einen diskreten Gradienten zwischen dorsalem und lateralem Kortex in frühen postnatalen Stadien. Eine Expression des Proteins wurde allerdings erst ab dem Stadium E17 detektiert. Des Weiteren fand sich in dem Stadium E17 eine stärkere Färbung der Neurone in den oberen Schichten der kortikalen Platte und in der Subplatte. In der kortikalen Platte befinden sich junge postmitotische Neurone, die aus der ventrikulären und subventrikulären Zone migriert sind [49]. In der Subplatte befinden sich während der Entwicklung junge geborene Neurone, die u.a. als Vorlage für die Kortexschichtung dienen [160, 161]. In den frühen postnatalen Stadien kristallisierte sich eine zunehmende Färbung der Neurone in den Schichten II, IV und V heraus. Während der weiteren postnatalen Entwicklung war das Proteinsignal in den Schichten II bis VI gleichmäßig zu finden und nahm nach dem Stadium P10 an Intensität ab. Die Beobachtung, dass die mRNA von PRG-3 während der embryonalen Entwicklung eine Verschiebung von tieferen Schichten im Entwicklungsstadium E15 in höhere Schichten ab dem Stadium E16 zeigt und dass das Protein in den spätembryonalen Stadien vornehmlich in der kortikalen Platte und Subplatte identifiziert wurde, ist ein Hinweis darauf, dass PRG-3 bei der Migration von Neuronen in die kortikale Platte und Subplatte involviert ist. Die dynamische Expression der mRNA und des Proteins während der Entwicklung mit der höchsten Expression in den späten bis zu den frühen postnatalen Stadien ist ein weiterer Hinweis darauf, dass PRG-3 bei der Neurogenese sowie der Initiierung und Aussprossung von Dendriten oder Axonen eine Rolle spielen könnte, da in diesem Entwicklungszeitraum die Ausbildung von Synapsen und das Aussprossen von Axonen stattfindet [10].

Beim Vergleich der mRNA-Expression mit der Proteinexpression in zwei verschiedenen Spezies zeigten sich zeitliche Unterschiede, die u.a. auf posttranskriptionale und translationale Modifikationen und die Tatsache, dass es zwischen den Spezies Unterschiede in der Regulation der mRNA und des Proteins geben kann, zurückgeführt werden können.

5.2.2 Expression von PRG-3 im sich entwickelnden Hippocampus

In der Dissertationsarbeit von Tanja Velmans wurde die mRNA- und die Proteinexpression von PRG-3 im Gehirn der Maus während der embryonalen und postnatalen Entwicklung im Kortex, Hippocampus, Cerebellum und Bulbus olfactorius mittels Real-time RT-PCR und Immunblot untersucht. Die stärkste Expression der mRNA war in den späten embryonalen und frühen postnatalen Stadien zu finden. Anschließend fiel die Intensität stetig wieder ab [152]. In dieser Arbeit wurde die Proteinexpression von PRG-3 spätembryonal ab dem Stadium E17, ein Maximum der Expression vom Geburtszeitpunkt bis zum Stadium P15 und ein Abfallen bis zum Stadium P30. Im Jahr 2004 publizierte Daten von Savaskan *et al.* zur mRNA-Expression von PRG-3 im Gehirn der Ratte ergab ein erstes Signal in der hippocampalen Anlage ab E16, wobei im Gyrus dentatus das Signal erst ab P0 zu detektieren war [144]. Diese Daten stehen in Konkordanz zu denen in dieser Arbeit. Von E19 bis P0 migrieren Neurone aus der Anlage des Gyrus dentatus in den definitiven Gyrus dentatus [60 - 62]. Da die Expression von PRG-3 gerade zu diesem Zeitpunkt ansteigt, kann ein Einfluss von PRG-3 in diesen Prozess impliziert werden.

Der weitere Anstieg der Signalintensität der mRNA und des Proteins in den frühen postnatalen Stadien korreliert mit dem ersten Aussprossen von Axonen aus dem Entorhinalkortex in den Hippocampus und mit der beginnenden Entwicklung und Ausbildung von Synapsen. Diese Prozesse beginnen ab E17 bei Nagetieren und erreichen das Maximum zwischen P0 und den ersten postnatalen Stadien [78, 79].

5.2.3 Expression von PRG-3 im sich entwickelnden Cerebellum

Die mRNA-Expression von PRG-3 im sich entwickelnden Cerebellum war in der Arbeit von Tanja Velmans zwischen den Stadien E14 bis E16 am stärksten ausgeprägt. Auf Proteinebene wurde ein erstes Signal ab dem Stadium E16 detektiert. Das Maximum zeigte sich zwischen P0 und P5, anschließend fiel das Signal kontinuierlich wieder ab [152]. In dieser Arbeit konnte in der Immunhistochemie das erste Signal zum Zeitpunkt der Geburt detektiert werden. In der weiteren postnatalen Entwicklung stieg die Intensität der Expression weiter an und verhielt sich dann relativ konstant. Da ab diesem Entwicklungsstadium die reifen Körnerzellen, die Neurone der Kerngebiete und die meisten Interneurone beginnen zu migrieren und die Ausbildung der Dendritenbäume der Purkinjezellen beginnt, könnte auch hierbei PRG-3 ein Einfluss in diese Prozesse zugesprochen werden [45].

5.3 PRG-4 wird konstant während der Gehirnentwicklung exprimiert

Im Gegensatz zu PRG-3 wurden zu PRG-4 bisher noch keine Untersuchungen zur Expression im Rattengehirn veröffentlicht. In dieser Arbeit wurde mit Hilfe des polyklonalen Antikörpers die Expression im sich Rattengehirn auf Proteinebene untersucht.

Im Immunblot, der mit Totalproteinlysaten aus Rattengehirnen der Stadien E13 bis P60 beladen wurde, konnte ein erstes schwaches Signal ab dem Stadium E16 detektiert werden. Die Expression stieg zum Zeitpunkt P0 stark an und blieb anschließend in allen untersuchten Regionen eine relativ konstant. Dieses Ergebnis zeigte, dass PRG-3 und PRG-4 embryonal nicht konkordant exprimiert werden.

5.3.1 Expression von PRG-4 im sich entwickelnden Kortex

Die Expression von PRG-4 im Kortex konnte ab dem Embryonalstadium E18 schwach in der kortikalen Platte und in der Subplatte detektiert werden. Ein starker Anstieg der Signalintensität war erst zum Zeitpunkt der Geburt (P0) zu verzeichnen. Während der weiteren postnatalen Entwicklung blieb die Signalintensität konstant. Daraus, dass PRG-4 erst spätembryonal exprimiert wird und zeitlebens präsent ist, ist zu schlussfolgern, dass dieses Protein während des gesamten postnatalen Lebens eine Rolle im ZNS spielen wird.

5.3.2 Expression von PRG-4 im sich entwickelnden Hippocampus

Im Hippocampus zeigte sich im Vergleich zum Kortex ein noch späterer Beginn der Expression. Ein erstes Signal konnte erst ab dem Stadium E21, kurz vor der Geburt, detektiert werden. Ab dem Zeitpunkt P0 stieg die Intensität dann stark an und persistierte bis zum

Stadium P30. Prozesse der axonalen Wegfindung und der Synpatogenese finden vornehmlich spätembryonal bzw. in den frühen postnatalen Entwicklungsstadien statt [78, 79]. PRG-4 könnte demnach eine Rolle bei der Entwicklung und Reifung der Neurone und derer Dendriten im Hippocampus spielen, die ab den spätembryonalen Stadien beginnen und bis zu den ersten zwei postnatalen Entwicklungswochen andauern [60].

5.3.3 Expression von PRG-4 im sich entwickelnden Cerebellum

Im Cerebellum wurde PRG-4 erst ab dem Stadium P0 in den jungen Körnerzellen der äußeren Körnerzellschicht identifiziert. Ab dem Stadium P5 stieg die Expression stark an und die typische Architektur des Cerebellums mit seiner Dreischichtung war zu erkennen. Bis zum Stadium P30 blieb die Expression vor allem in den Purkinjezellen und deren Dendriten stark präsent. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass PRG-4 eine Rolle im sich entwickelnden und adulten Cerebellum spielen könnte, da die Neurogenese im Cerebellum zwar in der mittleren embryonalen Phase beginnt, jedoch bis zu den ersten zwei postnatalen Wochen andauert [45, 48]. Darüber hinaus persistiert eine sog. sekundäre Neurogenese in der äußeren Körnerzellschicht bis in das Erwachsenenalter [54, 184].

5.4 Lokalisationsanalysen von PRG-3 und PRG-4

Bereits publizierte Daten zeigten, dass PRG-3 stark neuronal exprimiert wird [144, 152, 159]. In dieser Arbeit konnte verifiziert werden, dass PRG-3 und PRG-4 in nahezu allen Neuronen in den untersuchten Regionen Kortex, Hippocampus und Cerebellum existent sind.

5.4.1 Endogene Expression von PRG-3 und PRG-4 in Zelllinien

In einem Immunblot, der mit Proteinlysaten aus verschiedenen etablierten Zelllinien beladen wurde, wurde untersucht, ob PRG-3 und PRG-4 in diesen exprimiert werden. Dabei wurde ein Immunprodukt von PRG-3 in der Neuroblastoma-Zelllinie N1E-115 gefunden. Es ließen sich im Immunblot mehrere Banden nachweisen. PRG-4 zeigte im Immunblot ähnlich wie PRG-3 ein Immunprodukt auf mehreren Bandenhöhen in N1E-115-Zellen. In der Tumorzelllinie F98 erkannte der PRG-3-Antikörper eine Bande in Höhe von ca. 60 kDa und der PRG-4-Antikörper in Höhe von ca. 42 kDa. Diese Zelllinie entstammt aus Glioblastomzellen, einem malignen hirneigenen Tumor im Erwachsenenalter. In der Zelllinie Bv2, die als Modell für Mikroglia verwendet wird, erkannten die Antikörper gegen PRG-3 bzw. PRG-4 mehrere Banden.

In den letzten Jahren wurden mehr und mehr Daten zur Erforschung der Entstehung und Herkunft von hirneigenen Tumoren veröffentlicht. Es wurden in Medulloblastomzellen, einem malignen hirneigenen Tumor, der vornehmlich im Kindesalter auftritt, Eigenschaften dieser Tumorzellen anhand der Expression von verschiedenen Markerproteinen identifiziert, die ebenfalls von neuralen Progenitorzellen exprimiert werden [185]. Daraus lässt sich die Vermutung äußern, dass hirneigene Tumore u.a. von Progenitorzellen entstammen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass PRG-3 bzw. PRG-4 als mutierte Proteine oder durch noch unbekannte posttranslationale Modifikationen in diesen Zelllinien vorliegen könnten. Da es sich bei den untersuchten Zelllinien um Tumorzellen handelt, ist ein mutiert vorliegendes PRG-3 bzw. PRG-4 vor diesem Hintergrund also denkbar. Ein weiterer Diskussionspunkt ist die Tatsache, dass die verwendeten Zelllinien aus der Spezies Maus stammen und die Antikörper gegen PRG-3 bzw. PRG-4 für die Spezies Ratte generiert wurden. Im Epitop, das der PRG-3-Antikörper erkennt, liegen zwei Unterschiede in der Aminosäuresequenz des Proteins zwischen Ratte und Maus vor. Statt des Lysins 280 in der Ratte kodiert die Sequenz bei der Maus für Arginin und an der Stelle des Alanins 286 kodiert die Sequenz bei der Maus für Prolin [http://www.uniprot.org]. Bei dem Epitop, das der PRG-4-Antikörper erkennt, lagen keine Sequenzunterschiede zwischen Ratte und Maus vor [http://www.uniprot.org]. Es könnte demnach sein, dass zumindest der Antikörper gegen PRG-3 sein Epitop in der Spezies Maus nicht erkennt, da es Sequenzunterschiede in diesem Epitop zwischen den beiden Spezies gibt.

5.4.2 PRG-3 und PRG-4 werden spezifisch von Neuronen exprimiert

Eine feinmorphologische Analyse der zellulären Verteilung von PRG-3 und PRG-4 in der Spezies Ratte ist bisher noch nicht durchgeführt worden. Des Weiteren wurde bisher auch noch nicht untersucht, ob PRG-3 nur in Subpopulationen von Neuronen exprimiert wird.

Prä- und postnatal wies PRG-3 eine starke Expression in Neuronen in der Immunhistochemie auf. Das PRG-3-Signal wurde vor allem im Zellkörper und im proximalen Teil von Dendriten von nahezu allen Neuronen in den untersuchten Regionen im Gehirn der Ratte vorgefunden. In frühen postnatalen Entwicklungsstadien zeigte sich im Kortex und Hippocampus eine starke Expression von PRG-3 in den Zellsoma und proximalen und distalen Abschnitten von Dendriten. Mit zunehmendem Alter wurde das Signal in den distalen Dendritenabschnitten schwächer und war ab dem Stadium P15 stärker in proximalen und nur sehr schwach in distaleren Dendritenabschnitten zu finden. Im Cerebellum konnte PRG-3 im Dendritenbaum der Purkinjezellen bis in das Entwicklungsstadium P30 stark detektiert werden. Bei den immunhistochemischen Untersuchungen mit dem PRG-3-Antikörper zeigte sich ein schwaches Signal in axonalen Fortsätzen. Zur Unterscheidung der Neurone in Projektionsund Interneurone wurde PRG-3 mit den Markerproteinen Parvalbumin, Calbindin und Calretinin kolokalisiert. PRG-3 konnte in nahezu allen Interneuronen, die diese Marker exprimieren, detektiert werden.

PRG-4 zeigte in der DAB-Immunhistochemie eine ausgeprägte Expression in den Dendriten und im Soma von Neuronen. PRG-4 konnte in Subpopulationen von Interneuronen mit Parvalbumin, Calbindin und Calretinin kolokalisiert werden. Allerdings fand sich eine deutlich schwächere Expression in kortikalen Interneuronen im Vergleich zur Expression in Interneuronen im Hippocampus.

Diese Ergebnisse bestätigten, dass beide Proteine von exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen exprimiert werden.

5.4.3 PRG-3 wird nicht in Gliazellen exprimiert, PRG-4 wird in Oligodendrozyten exprimiert

Zur weiteren Charakterisierung des Expressionsmusters von PRG-3 und PRG-4 wurde untersucht, ob diese Proteine neben Neuronen auch von Gliazellen exprimiert werden. Tanja Velmans untersuchte in ihrer Arbeit das PRG-3-Protein in primären Astrozyten und Mikroglia und fand keine PRG-3-Expression in diesen Zellen [152]. Die Expression von PRG-4 wurde bisher noch nicht in Gliazellen untersucht.

PRG-3 konnte in dieser Arbeit in Doppelimmunfluoreszenzfärbungen mit GFAP und IB4 ebenfalls nicht in Astrozyten bzw. Mikroglia detektiert werden. Allerdings zeigte sich eine positive Expression von PRG-3 in der Doppelimmunfluoreszenz mit CNPase in reifen Oligodendrozyten. Frühere Entwicklungsstadien von Oligodendrozyten, die NG2 und O4 positiv sind, waren nicht PRG-3-immunreaktiv. PRG-4 konnte im Gegensatz zu PRG-3 in Doppelimmunfluoreszenzfärbungen schwach in Mikroglia mit IB4 kolokalisiert werden. Eine Expression in Astrozyten war nicht nachweisbar. Bei PRG-4 konnte darüber hinaus in den untersuchten Reifestadien von Oligodendrozyten detektiert werden. PRG-4 könnte demnach eine Rolle während der Entwicklung von Oligodendrozyten spielen. Da PRG-4 in allen untersuchten Entwicklungsstadien von Oligodendrozyten zu finden war, könnte für PRG-4 auch eine Rolle bei der Entstehung oder Stabilisierung von Myelinmembranen zukommen. Eine Interaktion mit Autotaxin bzw. dem LPA₁- Rezeptor wäre ebenfalls möglich, da beide in Vorläuferzellen von Oligodendrozyten exprimiert werden[181]. Da Autotaxin eine Rolle bei der Myelinisierung zugesprochen wird und es LPC in LPA umwandelt [137], dass anschließend mit dem LPA₁-Rezeptor interagieren kann, ist demnach ein Zusammenspiel zwischen PRG-4 und Autotaxin oder PRG-4 mit dem LPA₁-Rezeptor oder LPA in Erwägung zu ziehen.

5.5 PRG-3 und PRG-4 sind in synaptischen Strukturen lokalisiert

Die feinmorphologische und ultrastrukturelle Lokalisation beider Proteine wurde in Doppelimmunfluoreszenzfärbungen und mittels elektronenmikroskopischer Färbungen analysiert. Publizierte Vordaten zu PRG-3 aus *in vitro* Analysen in primären hippocampalen Mausneuronen und neuronalen Zelllinien zeigten, dass eine Überexpression von PRG-3 in Zelllinien zu einer Veränderung der Zellmorphologie führt [144, 145]. In primären Neuronen konnten diese morphologischen Veränderungen nicht beobachtet werden [152]. Dafür zeigte sich eine Verschiebung des PRG-3-Signals innerhalb der Zellen mit der Zunahme der Reifung der primären Neurone. Je länger sich die primären Neurone *in vitro* differenzierten, desto mehr transformierte sich das PRG-3-Signal von der Plasmamembran von undifferenzierten Neuriten, in differenzierte Axone und Dendriten und nach 14 Tagen in Kultur schließlich fast nur noch in Axone. Außerdem wurde in reifen primären Neuronen eine ausschließliche präsynaptische Lokalisation von PRG-3 beschrieben [152]. Aufbauend auf diesen Resultaten *in vitro* sollte untersucht werden, ob sich PRG-3 in Dendriten, Axonen und auf präsynaptischen Terminalen *in vivo* im Rattengehirn befindet.

5.5.1 PRG-3 ist überwiegend im Zellsoma und in Dendriten lokalisiert

Doppelimmunfluorenzfärbungen und die Elektronenmikroskopie wurden genutzt, um die Lokalisation von PRG-3 *in vivo* zu analysieren.

PRG-3 ließ sich mit dem Dendritenmarker MAP2 ab dem Entwicklungsstadium P15 vornehmlich im Zellsoma und im proximalen Part von Dendriten kolokalisieren. Mit dem axonalen Marker Tau1 konnte PRG-3 hingegen nicht kolokalisiert werden. Fasertrakte, wie der Moosfasertrakt im Hippocampus, wiesen kein PRG-3 auf. Im Stratum lucidum, in dem die Axone der Körnerzellen des Gyrus dentatus mit den Dendriten der Pyramidenzellen der CA3-Region interagieren, zeigte PRG-3 mit Calbindin nur teilweise Überlagerungen. Diese Resultate legten dar, dass PRG-3 vornehmlich im Zellsoma und in proximalen Dendriten und schwach auch in Axonterminalen lokalisiert ist. Da sich eine Dynamik der PRG-3-Expression im Verlauf der postnatalen Entwicklung in den Dendriten zeigte, kann diese darauf hindeuten, dass PRG-3 eine Rolle bei dem Auswachsen und der Differenzierung von Dendriten spielt. Das gepunktete Färbungsmuster von PRG-3 im Bereich von Dendriten und in Regionen, in

denen nachweislich synaptische Kontakte vorliegen, gab einen Hinweis darauf, dass PRG-3 in

synaptischen Strukturen lokalisiert ist. In Doppelimmunfluoreszenzfärbungen mit den präsynaptischen Markern konnte mit Synaptophysin, VGlut 1, VGlut 2 und VGat zu einem kleinen Teil eine Überlagerung mit PRG-3 detektiert werden. Die zum Teil diskrepanten Ergebnisse, dass PRG-3 in den *in vitro* Analysen in reifen primären Neuronen der Spezies Maus überwiegend axonal lokalisiert und in den *in vivo* Analysen im Rattengehirn überwiegend dendritisch lokalisiert war, könnte damit zusammenhängen, dass es, wenn auch unwahrscheinlich, innerhalb der Spezies Unterschiede geben könnte. Des Weiteren müssen *In vitro*-Analysen nicht unbedingt mit *In vivo*-Analysen übereinstimmend sein. Außerdem wurden in der Arbeit von Tanja Velmans polyklonale Antikörper verwendet, die gegen andere Epitope des PRG-3-Proteins gerichtet sind als der Antikörper, der in dieser Arbeit verwendet wurde. All diese Verschiedenheiten in den Versuchen können Ursachen für unterschiedliche Ergebnisse sein.

In dieser Arbeit konnte nicht mehr untersucht werden, ob PRG-3 auf der postsynaptischen Seite von Synapsen lokalisiert ist, was in zukünftigen Analysen erfolgen wird.

Ultrastrukturelle Analysen der DAB-Immunhistochemie von PRG-3 im Gyrus dentatus zeigten, dass PRG-3 in intrazellulären Membranstrukturen, wie dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi Apparat lokalisiert ist.

Zusammenfassend ist zu beschreiben, dass PRG-3 dynamisch während der Entwicklung im Gehirn der Ratte exprimiert wird. Es zeigt ein neuronenspezifisches Expressionsmuster, wobei es sowohl in Projektions- als auch Interneuronen zu finden ist. Es kommt intrazellulär vorwiegend im Zellsoma vor. PRG-3 findet sich in Gehirngewebe von Ratten in frühen postnatalen Entwicklungsstadien stärker und über eine längere Distanz in den Dendriten und später vornehmlich in proximalen Dendritenabschnitten. Ultrastrukturell imponierte das Immunprodukt überwiegend in zellulären Membranstrukturen, wie dem endoplasmatischen Retikulum und der Zellmembran. Für eine detaillierte ultrastrukturelle Untersuchung kann jedoch erst eine Immunogoldfärbung Aufschluss geben. Des Weiteren ergab sich lichtmikroskopisch ein gepunktetes Färbemuster im Bereich von synaptischen Kontakten. PRG-3 kann *in vivo* in der Spezies Ratte zu einem kleinen Teil mit präsynaptischen Markern kolokalisiert werden.

Diese Resultate lassen in Zusammenschau mit Vordaten vermuten, dass PRG-3 eine Rolle bei dem Aussprossen und der Differenzierung von Dendriten bzw. synaptischen Kontakten spielt. Durch seine Verwandtschaft mit den LPPs kann angenommen werden, dass PRG-3, welches keine Phosphataseaktivität ausweist, z.B. einen modulierenden Einfluss auf die Zellmorphologie über rezeptor-ähnliche Weise ausübt.

5.5.2 PRG-4 wird stark dendritisch exprimiert

Zu PRG-4 existieren keine Vordaten zu Lokalisationsanalysen auf Proteinebene. In dieser Arbeit wurde PRG-4 das erste Mal feinmorphologisch mittels Doppelimmunfluorenzfärbungen und ultrastrukturell mittels der Elektronenmikroskopie im Gehirngewebe von Ratten untersucht.

PRG-4 ist stark dendritisch lokalisiert und konnte mit dem Dendritenmarker MAP2 deutlich kolokalisiert werden. Eine axonale Expression zeigte sich nicht und PRG-4 konnte auch nicht mit dem axonalen Marker Tau1 und mit der schweren Untereinheit des Neurofilaments kolokalisiert werden.

Es wurde trotzdem untersucht, ob PRG-4 in präsynaptischen Strukturen vorkommt, da auch PRG-4 ein stark gepunktetes Färbemuster in Regionen nachgewiesener synaptischer Kontakte aufwies, welches als Indiz für seine Präsenz in solchen Strukturen gewertet wurde. Mit den präsynaptischen Markern Synaptophysin, VGlut 1, VGlut 2 und VGat konnte in Doppelimmunfluoreszenzanalysen jedoch keine Überlagerung gefunden werden. Das PRG-4-Signal befand sich immer direkt neben den Signalen der präsynaptischen Marker. Da PRG-4 auch nicht mit dem in axonalen Strukturen vorkommenden Mikrotubuli-assoziierten Protein Tau1 kolokalisiert werden konnte, sich jedoch in Dendriten stark nachweisen lässt, muss postuliert werden, dass PRG-4 postsynaptisch in Dendriten lokalisiert ist. Diese Analyse konnte in dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden, sodass es in zukünftigen Arbeiten zu erforschen sein wird, ob PRG-4 postsynaptisch lokalisiert ist und ob es mit postsynaptischen Markern, wie PSD 95 oder VAMP 2 (Synaptobrevin), kolokalisiert werden kann. Die ultrastrukturelle Analyse der DAB-Immunhistochemie im Gyrus dentatus ergab ähnlich zu PRG-3 eine Lokalisation des Immunprodukts in intrazellulären Membranstrukturen.

Zusammenfassend lässt sich über das Expressionsmuster von PRG-4 aussagen, dass es spätembryonal nur schwach in den untersuchten Regionen im Rattengehirn zu detektieren war. Auffällig war jedoch, dass ab dem Zeitpunkt der Geburt die Expression in Neuronen plötzlich stark anstieg. Besonders hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang, dass PRG-4 in der äußeren Körnerzellschicht im sich entwickelnden Cerebellum lokalisiert war. Dieses Resultat impliziert, dass es eine Rolle der Differenzierung oder Migration von jungen Körnerzellen spielt. Des Weiteren wurde aufgezeigt, dass PRG-4 rein dendritisch lokalisiert ist. Es konnte keine axonale Expression nachgewiesen werden und PRG-4 war auch nicht mit präsynaptischen Markern kolokalisierbar. PRG-4 konnte in allen untersuchten Reifestadien von Oligodendrozyten identifiziert werden. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass PRG-4 eine Rolle bei Myelinisierung spielen könnte. In diesem Kontext wäre für PRG-4 als ein Mitglied

der LPP Superfamilie und Membranprotein auch ein Zusammenspiel mit Autotaxin oder dem LPA₁-Rezeptor, die in unreifen Oligodendrozyten lokalisiert sind [181], möglich. Autotaxin generiert LPA, das axonales Aussprossen erschwert und Oligodendrozytenfunktionen beeinflusst [181]. PRG-4 könnte dabei eine modulierende Funktion bei Myelinisierungsprozessen während der Entwicklung ausüben. Ob PRG-4 ultrastrukturell z. B. in Myelinscheiden lokalisiert ist, kann in Analysen mit der Immunogoldfärbung zukünftig untersucht werden.

5.6 Ausblick

In dieser Arbeit wurde die endogene Expression zweier Mitglieder der Plasticity Related Gene Familie im sich entwickelnden Gehirn der Ratte systematisch auf Proteinebene untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass PRG-3 spezifisch in Neuronen exprimiert wird und während der Entwicklung dynamisch reguliert wird. In Zusammenhang mit geleisteten Vorarbeiten kann PRG-3 eine Rolle in der Neurogenese zugeschrieben werden. PRG-4 wurde erst ab dem Tag der Geburt hochreguliert und zeigte während der postnatalen Entwicklung ein konstantes Expressionsmuster. Neben einer starken Expression in Neuronen und deren Dendriten fand sich eine Expression in Oligodendrozyten verschiedener Reifestadien, weshalb für dieses Protein eine Rolle in der Myelinisierung postuliert wurde. PRG-3 war in Doppelimmunfluoreszenzanalysen zu einem kleinen Teil präsynaptisch lokalisiert, während PRG-4 nicht präsynaptisch nachgewiesen werden konnte. Demnach zeigen beide Proteine nicht nur eine komplementäre Regulation während der Entwicklung, sondern auch in ihrer zellulären und subzellulären Lokalisation eine zum Teil komplementäres Verteilungsmuster. Die Ergebnisse leisten einen Beitrag zum besseren Verständnis der Regulation von Membranproteinen, die eine modulierende Funktion auf Phospholipide ausüben, im ZNS während der Gehirnentwicklung.

Die Daten der endogenen Expression können genutzt werden, um zukünftig erarbeitete funktionelle Untersuchungen *in vivo* mit diesen zu vergleichen. Insbesondere könnten ultrastrukturelle Analysen z. B. mit der Immunogoldfärbung Aufschluss über die genaue subzelluläre Lokalisation beider Proteine innerhalb der Zelle geben. Eine zukünftige Analyse beider Proteine in Läsionsmodellen, z. B. nach einer ECL, erlaubt einen Vergleich und eine Verifizierung der hier erhobenen Ergebnisse in der Spezies Ratte. Damit tragen diese Erkenntnisse zukünftig zu einem weiteren Verständnis von Prozessen der Gehirnentwicklung und Regenerationsmechanismen bei Dysfunktionen des ZNS bei.

6. Zusammenfassung

Phospholipide sind bioaktive Signalmoleküle, die aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens ein breites Wirkungsspektrum aufweisen. Durch ihren rezeptorvermittelten Einfluss auf zahlreiche zelluläre Aktivitäten, wie z.B. die Zellmigration, Zellproliferation, Zellaggregation oder Änderung des Zytoskeletts, sind Phospholipide unter anderem in Prozesse der Atherosklerose, Angiogenese und Wundheilung und Entzündungsreaktion oder Tumorentstehung bzw. des Tumorwachstums involviert. Darüber hinaus werden den bioaktiven Phospholipiden regulatorische Funktionen unter anderem in Entwicklungsprozesse im ZNS zugesprochen. In den letzten Jahren wuchs in diesem Zusammenhang auch das wissenschaftliche Interesse an Phospholipid-modulierenden Proteinen im ZNS, die Phospholipid-vermittelte Prozesse unter anderem durch die Modifikation des Verhältnisses zwischen den Phospholipiden und ihren zum Teil ebenfalls bioaktiven Metaboliten regulieren. Solch ein Phospholipid-modulierendes Protein, das Plasticity Related Gene (PRG-1), wurde auf der Suche nach Proteinen, die in Regenerationsprozesse im ZNS involviert sind, entdeckt. Zu der Gruppe der PRGs zählen mittlerweile fünf Mitglieder, die alle gehirnspezifisch exprimiert werden. Ergebnisse zum PRG-3-Protein auf zellulärer Ebene in der Spezies Maus bzw. zur PRG-3-mRNA in den Spezies Maus und Ratte zeigten eine dynamische Expression während der Gehirnentwicklung. Weiterhin induziert eine Überexpression des rekombinanten PRG-3-Proteins eine Veränderung der Zellmorphologie in vitro. Zu PRG-4 existieren bisher keine veröffentlichten Ergebnisse.

In dieser Arbeit wurde nun anlehnend an publizierte Daten das Expressionsmuster von PRG-3 und PRG-4 systematisch im sich entwickelnden Rattengehirn auf Proteinebene *in vivo* untersucht.

Mit Hilfe eines nicht kommerziell erhältlichen polyklonalen Antikörpers wurde eine zeitabhängige Expression des PRG-3-Proteins während Gehirnentwicklung bestätigt. Während der spätembryonalen und frühpostnatalen Entwicklung im Kortex wurde stützend auf publizierte Ergebnisse über eine Verschiebung des mRNA-Signals von basalen Schichten in apikalere Schichten ebenfalls beobachtet, dass das PRG-3-Protein spätembryonal in höheren Schichten der kortikalen Platte lokalisiert ist. In der Immunhistochemie fiel zusätzlich auf, dass das PRG-3-Protein in den zunehmenden postnatalen Entwicklungsstadien stetig schwächer in den distaleren Abschnitten von Dendriten detektierbar war. Diese Ergebnisse lassen auf einen Einfluss des PRG-3-Proteins in Prozesse der Zellmigration und damit der Kortikogenese und der Dendritogenese schließen. Ferner wurden in dieser Arbeit bereits vorliegende Untersuchungsergebnisse zur mRNA- und Proteinexpression auf

zellulärer Ebene bekräftigt, die ergaben, dass PRG-3 neuronenspezifisch exprimiert wird. In Doppelimmunfluoreszenzanalysen in Rattengehirnen wurde keine Expression des PRG-3-Proteins in Gliazellen nachgewiesen. Des Weiteren ergab eine Subspezifizierung der Neurone mittels Interneuronmarkern, dass PRG-3 in Projektions- und Interneuronen exprimiert wird. Feinmorphologisch fiel ein stark gepunktetes Färbemuster von PRG-3 auf, das vornehmlich dendritisch lokalisiert war. Bei Doppelimmunfluoreszenzanalysen mit präsynaptischen Markern wurde zu einem geringen Anteil eine Kolokalisation in exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen detektiert. Ultrastrukturell bestätigte sich eine Lokalisation von PRG-3 in Membranstrukturen. Demnach könnte PRG-3 als Membranprotein und als ein Mitglied einer Gruppe von Proteinen, die Phospholipidsignale modulieren, dort in Signalwege involviert sein.

Die Expression des PRG-4-Proteins wurde ebenfalls systematisch mit einem nicht kommerziell erhältlichen polyklonalen Antikörper *in vivo* im Rattengehirn analysiert. Im Gegensatz zu PRG-3 wurde das PRG-4-Protein während der Gehirnentwicklung konstant exprimiert. Darüber hinaus wies PRG-4 erst ab dem Tag der Geburt eine starke Expression auf. Während der postnatalen Entwicklung des Cerebellums wurde PRG-4 zunächst überwiegend in Vorläuferzellen der äußeren Körnerzellschicht, aus der postnatal junge Körnerzellen in die definitive Körnerzellschicht migrieren, detektiert. Deshalb wurde postuliert, dass PRG-4 an der Neurogenese der Körnerzellen im Cerebellum beteiligt ist.

PRG-4 wurde stark in Neuronen und in Oligodendrozyten verschiedener Reifestadien detektiert. Ultrastrukturell war PRG-4 ebenfalls in Membranstrukturen lokalisiert. Nach seiner Präsenz in verschiedenen Reifestadien von Oligodendrozyten könnte PRG-4 eine Rolle bei der Myelinisierung zugesprochen werden. Das PRG-4-Protein wurde im Unterschied zum PRG-3-Protein nicht in präsynaptischen Strukturen lokalisiert. Es wies eine ausschließliche Expression in Dendriten auf. Damit kann davon ausgegangen werden, dass PRG-4 postsynaptisch lokalisiert ist.

Die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse zeigten ein eher komplementäres Expressionsmuster zweier phylogenetisch naher verwandter Membranproteine, für die modulierende Einflüsse auf Phospholipide postuliert werden. Die systematische Analyse der Expression während der Gehirnentwicklung am Beispiel der Spezies Ratte sollte ein weiterer Baustein zur Erforschung des Zusammenspiels zwischen Phospholipiden und den PRGs und daraus resultierender molekularer Mechanismen von Entwicklungsprozessen des ZNS sein.

7. Literatur

- 1. Duque-Parra, J.E., *Functional neuroanatomy: the first daughter of neuroscience and the mother of neural science.* Anat Rec, 2001. 265(6): p. 250-3.
- 2. Abbe, E., *Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung*. Archiv für Mikroskopische Anatomie, Vol. 9, No. 1. (1 December 1873), pp. 413-418.
- 3. Tan, S.Y. and K.H. Lin, *Johannes Evangelista Purkinje (1787-1869): 19th century's foremost phenomenologist.* Singapore Med J, 2005. 46(5): p. 208-9.
- 4. Sotelo, C., *Camillo Golgi and Santiago Ramon y Cajal: the anatomical organization of the cortex of the cerebellum. Can the neuron doctrine still support our actual knowledge on the cerebellar structural arrangement?* Brain Res Rev, 2011. 66(1-2): p. 16-34.
- 5. Glickstein, M., Golgi and Cajal: The neuron doctrine and the 100th anniversary of the 1906 Nobel Prize. Curr Biol, 2006. 16(5): p. R147-51.
- 6. L.R. Squire, D. Berg, F. E. Bloom, S. du Lac, A. Ghosh, and N. C. Spitzer, *Fundamental neuroscience*. Academic Press, 2008.
- 7. Jones, E.G., *Neuroanatomy: Cajal and after Cajal.* Brain Res Rev, 2007. 55(2): p. 248-55.
- 8. Palay, S.L., *Synapses in the central nervous system*. J Biophys Biochem Cytol, 1956. 2(4 Suppl): p. 193-202.
- 9. Temburni, M.K. and M.H. Jacob, *New functions for glia in the brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(7): p. 3631-2.
- 10. Waites, C.L., A.M. Craig, and C.C. Garner, *Mechanisms of vertebrate synaptogenesis*. Annu Rev Neurosci, 2005. 28: p. 251-74.
- 11. G. Paxinos, The Rat Nervous System. Academic Press, 2004
- 12. Morest, D.K. and J. Silver, *Precursors of neurons, neuroglia, and ependymal cells in the CNS: what are they? Where are they from? How do they get where they are going?* Glia, 2003. 43(1): p. 6-18.
- 13. Wiggin, G.R., J.P. Fawcett, and T. Pawson, *Polarity proteins in axon specification and synaptogenesis*. Dev Cell, 2005. 8(6): p. 803-16.
- 14. Zilles, Karl und Tillmann, Bernhard N.: *Anatomie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010.
- 15. Peters, A. and E.G. Jones, *Cerebral cortex. Volume 1, Cellular components of the cerebral cortex.* 1984, New York ; London: Plenum. xiv, 565 p.

- 16. Palay, S.L. and V. Chan-Palay, *The cerebellum : new vistas*. Experimental brain research. Supplementum, 1982, Berlin ; New York: Springer-Verlag. xvii, 637 p.
- 17. Zecevic, N., F. Hu, and I. Jakovcevski, *Interneurons in the developing human neocortex*. Dev Neurobiol, 2011. 71(1): p. 18-33.
- 18. Hevner, R.F., et al., *Beyond laminar fate: toward a molecular classification of cortical projection/pyramidal neurons.* Dev Neurosci, 2003. 25(2-4): p. 139-51.
- Ullian, E.M., et al., *Control of synapse number by glia*. Science, 2001. 291(5504): p. 657-61.
- 20. Sharma, G. and S. Vijayaraghavan, *Nicotinic cholinergic signaling in hippocampal astrocytes involves calcium-induced calcium release from intracellular stores.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(7): p. 4148-53.
- 21. Schipke, C.G. and H. Kettenmann, *Astrocyte responses to neuronal activity*. Glia, 2004. 47(3): p. 226-32.
- 22. Kriegstein, A. and A. Alvarez-Buylla, *The glial nature of embryonic and adult neural stem cells*. Annu Rev Neurosci, 2009. 32: p. 149-84.
- 23. Gotz, M. and W.B. Huttner, *The cell biology of neurogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. 6(10): p. 777-88.
- 24. Marin-Padilla, M., *Cajal-Retzius cells and the development of the neocortex*. Trends Neurosci, 1998. 21(2): p. 64-71.
- 25. Pekny, M. and M. Nilsson, *Astrocyte activation and reactive gliosis*. Glia, 2005. 50(4): p. 427-34.
- 26. McLendon, R.E. and D.D. Bigner, *Immunohistochemistry of the glial fibrillary acidic protein: basic and applied considerations*. Brain Pathol, 1994. 4(3): p. 221-8.
- 27. Baba, H., et al., *GFAP gene expression during development of astrocyte*. Dev Neurosci, 1997. 19(1): p. 49-57.
- 28. Privat, A., *Astrocytes as support for axonal regeneration in the central nervous system of mammals*. Glia, 2003. 43(1): p. 91-3.
- 29. Lappe-Siefke, C., et al., *Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination*. Nat Genet, 2003. 33(3): p. 366-74.
- 30. Baumann, N. and D. Pham-Dinh, *Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system.* Physiol Rev, 2001. 81(2): p. 871-927.
- 31. Bradl, M. and H. Lassmann, *Oligodendrocytes: biology and pathology*. Acta Neuropathol, 2010. 119(1): p. 37-53.
- 32. Kettenmann, H., et al., *Physiology of microglia*. Physiol Rev, 2011. 91(2): p. 461-553.

- 33. Prinz, M. and A. Mildner, *Microglia in the CNS: immigrants from another world*. Glia, 2011. 59(2): p. 177-87.
- 34. Lee, C.H., et al., Long-term changes in neuronal degeneration and microglial activation in the hippocampal CA1 region after experimental transient cerebral ischemic damage. Brain Res, 2010. 1342: p. 138-49.
- 35. Yang, I., et al., *The role of microglia in central nervous system immunity and glioma immunology*. J Clin Neurosci, 2010. 17(1): p. 6-10.
- 36. Lavenex, P., P. Banta Lavenex, and D.G. Amaral, *Postnatal development of the primate hippocampal formation*. Dev Neurosci, 2007. 29(1-2): p. 179-92.
- Lagali, P.S., C.P. Corcoran, and D.J. Picketts, *Hippocampus development and function: role of epigenetic factors and implications for cognitive disease*. Clin Genet, 2010. 78(4): p. 321-33.
- 38. Deller, T., et al., *The alvear pathway of the rat hippocampus*. Cell Tissue Res, 1996. 286(3): p. 293-303.
- 39. Kajiwara, R., et al., Convergence of entorhinal and CA3 inputs onto pyramidal neurons and interneurons in hippocampal area CA1--an anatomical study in the rat. Hippocampus, 2008. 18(3): p. 266-80.
- 40. Skutella, T. and R. Nitsch, *New molecules for hippocampal development*. Trends Neurosci, 2001. 24(2): p. 107-13.
- 41. Frotscher, M., A. Drakew, and B. Heimrich, *Role of afferent innervation and neuronal activity in dendritic development and spine maturation of fascia dentata granule cells.* Cereb Cortex, 2000. 10(10): p. 946-51.
- 42. Frotscher, M., et al., Understanding the cortex through the hippocampus: lamina-specific connections of the rat hippocampal neurons. J Anat, 1995. 187 (Pt 3): p. 539-45.
- 43. Morales, D. and M.E. Hatten, *Molecular markers of neuronal progenitors in the embryonic cerebellar anlage*. J Neurosci, 2006. 26(47): p. 12226-36.
- 44. Sudarov, A. and A.L. Joyner, *Cerebellum morphogenesis: the foliation pattern is orchestrated by multi-cellular anchoring centers.* Neural Dev, 2007. 2: p. 26.
- 45. Sotelo, C., *Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system*. Prog Neurobiol, 2004. 72(5): p. 295-339.
- 46. Eccles, J.C., *Neurogenesis and morphogenesis in the cerebellar cortex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1970. 66(2): p. 294-301.
- 47. Millen, K.J., et al., *Neurogenetics of the cerebellar system*. J Child Neurol, 1999. 14(9): p. 574-81; discussion 581-2.

- 48. Sillitoe, R.V. and A.L. Joyner, *Morphology, molecular codes, and circuitry produce the three-dimensional complexity of the cerebellum.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2007. 23: p. 549-77.
- 49. Gupta, A., L.H. Tsai, and A. Wynshaw-Boris, *Life is a journey: a genetic look at neocortical development*. Nat Rev Genet, 2002. 3(5): p. 342-55.
- 50. Guillemot, F., et al., *Molecular mechanisms of cortical differentiation*. Eur J Neurosci, 2006. 23(4): p. 857-68.
- 51. Kubo, K. and K. Nakajima, *Cell and molecular mechanisms that control cortical layer formation in the brain.* Keio J Med, 2003. 52(1): p. 8-20.
- 52. Noctor, S.C., et al., *Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases.* Nat Neurosci, 2004. 7(2): p. 136-44.
- 53. Merkle, F.T. and A. Alvarez-Buylla, *Neural stem cells in mammalian development*. Curr Opin Cell Biol, 2006. 18(6): p. 704-9.
- 54. Inta, D., et al., *Neurogenesis and widespread forebrain migration of distinct GABAergic neurons from the postnatal subventricular zone*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(52): p. 20994-9.
- 55. Sibbe, M., et al., *Reelin and Notch1 cooperate in the development of the dentate gyrus.* J Neurosci, 2009. 29(26): p. 8578-85.
- 56. Rickmann, M., D.G. Amaral, and W.M. Cowan, *Organization of radial glial cells during the development of the rat dentate gyrus*. J Comp Neurol, 1987. 264(4): p. 449-79.
- 57. Nowakowski, R.S., *Development of the hippocampal formation in mutant mice*. Drug Dev Res, 1988. 15: 315–336
- 58. Gould, E. and P. Tanapat, *Stress and hippocampal neurogenesis*. Biol Psychiatry, 1999. 46(11): p. 1472-9.
- 59. Bayer, S.A., Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with 3H-thymidine autoradiography. J Comp Neurol, 1980. 190(1): p. 87-114.
- 60. Rahimi, O. and B.J. Claiborne, *Morphological development and maturation of granule neuron dendrites in the rat dentate gyrus.* Prog Brain Res, 2007. 163: p. 167-81.
- 61. Altman, J. and S.A. Bayer, *Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinal sources of dentate granule cells.* J Comp Neurol, 1990. 301(3): p. 325-42.
- 62. Reznikov, K.Y., *Cell proliferation and cytogenesis in the mouse hippocampus*. Adv Anat Embryol Cell Biol, 1991. 122: p. 1-74.

- 63. Altman, J. and S.A. Bayer, *Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods*. J Comp Neurol, 1990. 301(3): p. 365-81.
- 64. Kempermann, G., H.G. Kuhn, and F.H. Gage, *More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment*. Nature, 1997. 386(6624): p. 493-5.
- 65. Hartfuss, E., et al., *Reelin signaling directly affects radial glia morphology and biochemical maturation*. Development, 2003. 130(19): p. 4597-609.
- 66. Frotscher, M., S. Zhao, and E. Forster, *Development of cell and fiber layers in the dentate gyrus*. Prog Brain Res, 2007. 163: p. 133-42.
- 67. Frotscher, M., et al., *Role of Reelin in the development and maintenance of cortical lamination*. J Neural Transm, 2009. 116(11): p. 1451-5.
- 68. Chizhikov, V. and K.J. Millen, *Development and malformations of the cerebellum in mice*. Mol Genet Metab, 2003. 80(1-2): p. 54-65.
- 69. Imayoshi, I., et al., *Continuous neurogenesis in the adult brain*. Dev Growth Differ, 2009. 51(3): p. 379-86.
- 70. Alvarez-Buylla, A. and J.M. Garcia-Verdugo, *Neurogenesis in adult subventricular zone*. J Neurosci, 2002. 22(3): p. 629-34.
- 71. Ninkovic, J. and M. Gotz, *Signaling in adult neurogenesis: from stem cell niche to neuronal networks*. Curr Opin Neurobiol, 2007. 17(3): p. 338-44.
- 72. Mongiat, L.A. and A.F. Schinder, *Adult neurogenesis and the plasticity of the dentate gyrus network*. Eur J Neurosci, 2011. 33(6): p. 1055-61.
- 73. Tramontin, A.D., et al., *Postnatal development of radial glia and the ventricular zone* (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. Cereb Cortex, 2003. 13(6): p. 580-7.
- 74. Zhang, S.C., *Defining glial cells during CNS development*. Nat Rev Neurosci, 2001. 2(11): p. 840-3.
- 75. Nicolay, D.J., J.R. Doucette, and A.J. Nazarali, *Transcriptional control of oligodendrogenesis*. Glia, 2007. 55(13): p. 1287-99.
- Bolsover, S., J. Fabes, and P.N. Anderson, *Axonal guidance molecules and the failure of axonal regeneration in the adult mammalian spinal cord*. Restor Neurol Neurosci, 2008. 26(2-3): p. 117-30.
- 77. Cruz-Orengo, L., et al., *Reduction of EphA4 receptor expression after spinal cord injury does not Induce axonal regeneration or return of tcMMEP response*. Neurosci Lett, 2007. 418(1): p. 49-54.

- 78. Ceranik, K., S. Zhao, and M. Frotscher, *Development of the entorhino-hippocampal projection: guidance by Cajal-Retzius cell axons.* Ann N Y Acad Sci, 2000. 911: p. 43-54.
- 79. Turner, D.A., et al., *Morphological features of the entorhinal-hippocampal connection*. Prog Neurobiol, 1998. 55(6): p. 537-62.
- 80. Tessier-Lavigne, M. and C.S. Goodman, *The molecular biology of axon guidance*. Science, 1996. 274(5290): p. 1123-33.
- 81. Merkle, F.T., et al., *Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(50): p. 17528-32.
- 82. Courtes, S., et al., *Reelin controls progenitor cell migration in the healthy and pathological adult mouse brain.* PloS one, 2011. 6(5): p. e20430.
- 83. Couillard-Despres, S., et al., *Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis.* Eur J Neurosci, 2005. 21(1): p. 1-14.
- 84. Kennedy, T.E., et al., *Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord.* Cell, 1994. 78(3): p. 425-35.
- 85. Chilton, J.K., Molecular mechanisms of axon guidance. Dev Biol, 2006. 292(1): p. 13-24.
- 86. Gibson, D.A. and L. Ma, *Developmental regulation of axon branching in the vertebrate nervous system*. Development, 2011. 138(2): p. 183-95.
- 87. Rajasekharan, S. and T.E. Kennedy, *The netrin protein family*. Genome Biol, 2009. 10(9): p. 239.
- 88. Mattson, M.P., *Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease*. Ann N Y Acad Sci, 2008. 1144: p. 97-112.
- 89. Dent, E.W., et al., *Netrin-1 and semaphorin 3A promote or inhibit cortical axon branching, respectively, by reorganization of the cytoskeleton.* J Neurosci, 2004. 24(12): p. 3002-12.
- 90. Stoenica, L., et al., *In vivo synaptic plasticity in the dentate gyrus of mice deficient in the neural cell adhesion molecule NCAM or its polysialic acid.* Eur J Neurosci, 2006. 23(9): p. 2255-64.
- 91. Shen, Y., et al., *Growth-associated protein-43 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system.* J Neurosci, 2002. 22(1): p. 239-47.
- 92. Sigal, Y.J., M.I. McDermott, and A.J. Morris, *Integral membrane lipid phosphatases/phosphotransferases: common structure and diverse functions*. Biochem J, 2005. 387(Pt 2): p. 281-93.

- 93. Smith, S.W., S.B. Weiss, and E.P. Kennedy, *The enzymatic dephosphorylation of phosphatidic acids*. J Biol Chem, 1957. 228(2): p. 915-22.
- 94. Kai, M., et al., Identification and cDNA cloning of 35-kDa phosphatidic acid phosphatase (type 2) bound to plasma membranes. Polymerase chain reaction amplification of mouse H2O2-inducible hic53 clone yielded the cDNA encoding phosphatidic acid phosphatase. J Biol Chem, 1996. 271(31): p. 18931-8.
- 95. Kai, M., et al., Cloning and characterization of two human isozymes of Mg2+independent phosphatidic acid phosphatase. J Biol Chem, 1997. 272(39): p. 24572-8.
- 96. Waggoner, D.W., et al., *Structural organization of mammalian lipid phosphate phosphatases: implications for signal transduction*. Biochim Biophys Acta, 1999. 1439(2): p. 299-316.
- 97. Brindley, D.N., *Lipid phosphate phosphatases and related proteins: signaling functions in development, cell division, and cancer.* J Cell Biochem, 2004. 92(5): p. 900-12.
- 98. Jamal, Z., et al., *Plasma membrane fractions from rat liver contain a phosphatidate phosphohydrolase distinct from that in the endoplasmic reticulum and cytosol.* J Biol Chem, 1991. 266(5): p. 2988-96.
- 99. Brindley, D.N., et al., *Lipid phosphate phosphatases regulate signal transduction through glycerolipids and sphingolipids*. Biochim Biophys Acta, 2002. 1582(1-3): p. 33-44.
- 100. Mao, C., et al., *Identification and characterization of Saccharomyces cerevisiae dihydrosphingosine-1-phosphate phosphatase*. J Biol Chem, 1997. 272(45): p. 28690-4.
- 101. Brindley, D.N., et al., *Phosphatidate degradation: phosphatidate phosphatases (lipins)* and lipid phosphate phosphatases. Biochim Biophys Acta, 2009. 1791(9): p. 956-61.
- 102. Brindley, D.N. and C. Pilquil, *Lipid phosphate phosphatases and signaling*. J Lipid Res, 2009. 50 Suppl: p. S225-30.
- 103. Sciorra, V.A. and A.J. Morris, Sequential actions of phospholipase D and phosphatidic acid phosphohydrolase 2b generate diglyceride in mammalian cells. Mol Biol Cell, 1999. 10(11): p. 3863-76.
- 104. Roberts, R.Z. and A.J. Morris, *Role of phosphatidic acid phosphatase 2a in uptake of extracellular lipid phosphate mediators*. Biochim Biophys Acta, 2000. 1487(1): p. 33-49.
- 105. Nanjundan, M. and F. Possmayer, *Pulmonary lipid phosphate phosphohydrolase in plasma membrane signalling platforms*. Biochem J, 2001. 358(Pt 3): p. 637-46.
- 106. Tomsig, J.L., et al., *Lipid phosphate phosphohydrolase type 1 (LPP1) degrades* extracellular l ysophosphatidic acid in vivo. Biochem J, 2009. 419(3): p. 611-8.
- 107. Kai, M., et al., *Lipid phosphate phosphatases 1 and 3 are localized in distinct lipid rafts.* J Biochem, 2006. 140(5): p. 677-86.

- 108. Sciorra, V.A. and A.J. Morris, *Roles for lipid phosphate phosphatases in regulation of cellular signaling*. Biochim Biophys Acta, 2002. 1582(1-3): p. 45-51.
- Escalante-Alcalde, D., S.L. Morales, and C.L. Stewart, *Generation of a reporter-null allele of Ppap2b/Lpp3and its expression during embryogenesis*. Int J Dev Biol, 2009. 53(1): p. 139-47.
- Nanjundan, M. and F. Possmayer, *Molecular cloning and expression of pulmonary lipid phosphate phosphohydrolases*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001. 281(6): p. L1484-93.
- 111. Hooks, S.B., S.P. Ragan, and K.R. Lynch, *Identification of a novel human phosphatidic acid phosphatase type 2 isoform*. FEBS Lett, 1998. 427(2): p. 188-92.
- 112. Zhang, N., J.P. Sundberg, and T. Gridley, *Mice mutant for Ppap2c, a homolog of the germ cell migration regulator wunen, are viable and fertile.* Genesis, 2000. 27(4): p. 137-40.
- 113. Escalante-Alcalde, D., et al., *The lipid phosphatase LPP3 regulates extra-embryonic vasculogenesis and axis patterning*. Development, 2003. 130(19): p. 4623-37.
- Lopez-Juarez, A., et al., Expression of LPP3 in Bergmann glia is required for proper cerebellar sphingosine-1-phosphate metabolism/signaling and development. Glia, 2011. 59(4): p. 577-89.
- 115. Lee, S.J. and C.C. Yun, *Colorectal cancer cells Proliferation, survival and invasion by lysophosphatidic acid.* Int J Biochem Cell Biol, 2010. 42(12): p. 1907-10.
- 116. Lummen, G., et al., *Identification of G protein-coupled receptors potently stimulating migration of human transitional-cell carcinoma cells.* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1997. 356(6): p. 769-76.
- Balazs, L., et al., *Topical application of the phospholipid growth factor lysophosphatidic acid promotes wound healing in vivo*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2001. 280(2): p. R466-72.
- Kingsbury, M.A., et al., Genetics and cell biology of lysophosphatidic acid receptormediated signaling during cortical neurogenesis. J Cell Biochem, 2004. 92(5): p. 1004-12.
- 119. Inoue, M., et al., *Initiation of neuropathic pain requires lysophosphatidic acid receptor signaling*. Nat Med, 2004. 10(7): p. 712-8.
- 120. Pradere, J.P., et al., *LPA1 receptor activation promotes renal interstitial fibrosis*. J Am Soc Nephrol, 2007. 18(12): p. 3110-8.
- 121. 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.

- 122. Zhao, Y. and V. Natarajan, *Lysophosphatidic acid signaling in airway epithelium: role in airway inflammation and remodeling.* Cell Signal, 2009. 21(3): p. 367-77.
- 123. Ishii, I., et al., *Lysophospholipid receptors: signaling and biology*. Annu Rev Biochem, 2004. 73: p. 321-54.
- 124. Birgbauer, E. and J. Chun, New developments in the biological functions of lysophospholipids. Cell Mol Life Sci, 2006. 63(23): p. 2695-701.
- 125. Eichholtz, T., et al., *The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets*. Biochem J, 1993. 291 (Pt 3): p. 677-80.
- 126. 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.
- Schumacher, K.A., H.G. Classen, and M. Spath, *Platelet aggregation evoked in vitro and in vivo by phosphatidic acids and lysoderivatives: identity with substances in aged serum (DAS)*. Thromb Haemost, 1979. 42(2): p. 631-40.
- 128. Tigyi, 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.
- 129. Yuan, X.B., et al., *Signalling and crosstalk of Rho GTPases in mediating axon guidance*. Nat Cell Biol, 2003. 5(1): p. 38-45.
- 130. Ramakers, G.J. and W.H. Moolenaar, *Regulation of astrocyte morphology by RhoA and lysophosphatidic acid.* Exp Cell Res, 1998. 245(2): p. 252-62.
- 131. 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.
- 132. Kingsbury, M.A., et al., *Non-proliferative effects of lysophosphatidic acid enhance cortical growth and folding*. Nat Neurosci, 2003. 6(12): p. 1292-9.
- 133. Chun, J., *Lysophospholipids in the nervous system*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2005. 77(1-4): p. 46-51.
- 134. 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.
- 135. Okudaira, S., H. Yukiura, and J. Aoki, *Biological roles of lysophosphatidic acid signaling through its production by autotaxin.* Biochimie, 2010. 92(6): p. 698-706.
- 136. Fukushima, N., X. Ye, and J. Chun, *Neurobiology of lysophosphatidic acid signaling*. Neuroscientist, 2002. 8(6): p. 540-50.

- 137. Tokumura, A., *Physiological and pathophysiological roles of lysophosphatidic acids produced by secretory lysophospholipase D in body fluids*. Biochim Biophys Acta, 2002. 1582(1-3): p. 18-25.
- 138. van Meeteren, L.A., et al., Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. Mol Cell Biol, 2006. 26(13): p. 5015-22.
- 139. Tanyi, J.L., et al., *The human lipid phosphate phosphatase-3 decreases the growth, survival, and tumorigenesis of ovarian cancer cells: validation of the lysophosphatidic acid signaling cascade as a target for therapy in ovarian cancer.* Cancer Res, 2003. 63(5): p. 1073-82.
- 140. Smyth, S.S., et al., *Lipid phosphate phosphatases regulate lysophosphatidic acid production and signaling in platelets: studies using chemical inhibitors of lipid phosphate phosphatase activity.* J Biol Chem, 2003. 278(44): p. 43214-23.
- 141. 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.
- 142. Trimbuch, T., et al., Synaptic PRG-1 modulates excitatory transmission via lipid phosphate-mediated signaling. Cell, 2009. 138(6): p. 1222-35.
- 143. 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.
- 144. Savaskan, N.E., A.U. Brauer, and R. Nitsch, *Molecular cloning and expression regulation of PRG-3, a new member of the plasticity-related gene family.* Eur J Neurosci, 2004. 19(1): p. 212-20.
- 145. Sigal, Y.J., et al., *Cdc42 and ARP2/3-independent regulation of filopodia by an integral membrane lipid-phosphatase-related protein.* J Cell Sci, 2007. 120(Pt 2): p. 340-52.
- 146. Broggini, T., R. Nitsch, and N.E. Savaskan, *Plasticity-related gene 5 (PRG5) induces filopodia and neurite growth and impedes lysophosphatidic acid- and nogo-A-mediated axonal retraction*. Mol Biol Cell, 2010. 21(4): p. 521-37.
- 147. 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.
- 148. Meier, S., et al., *Molecular analysis of Nogo expression in the hippocampus during development and following lesion and seizure.* FASEB J, 2003. 17(9): p. 1153-5.
- 149. Sato, A., et al., Cerebellar development transcriptome database (CDT-DB): profiling of spatio-temporal gene expression during the postnatal development of mouse cerebellum. Neural Netw, 2008. 21(8): p. 1056-69.
- 150. Kubo, K. and K. Nakajima, *Cell and molecular mechanisms that control cortical layer formation in the brain.* Keio J Med, 2003. 52(1): p. 8-20.

- 151. Taylor, G.S. and J.E. Dixon, An assay for phosphoinositide phosphatases utilizing fluorescent substrates. Anal Biochem, 2001. 295(1): p. 122-6.
- 152. Velmans, T., Funktion und Expression von Plasticity Related Gene 3 und Lipid Phosphat Phosphatase 1 und -1a während der Gehirnentwicklung. Dissertationsarbeit, 2009.
- 153. Barth, R.F. and B. Kaur, *Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6*, *9L*, *T9*, *RG2*, *F98*, *BT4C*, *RT-2 and CNS-1 gliomas*. J Neurooncol, 2009. 94(3): p. 299-312.
- 154. Henn, A., et al., The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. ALTEX, 2009. 26(2): p. 83-94.
- 155. Blasi, E., et al., *Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus*. J Neuroimmunol, 1990. 27(2-3): p. 229-37.
- 156. Schwarz, P.M., et al., *Expressional down-regulation of neuronal-type nitric oxide* synthase I by glucocorticoids in N1E-115 neuroblastoma cells. Mol Pharmacol, 1998. 54(2): p. 258-63.
- 157. Kimhi, Y., et al., Maturation of neuroblastoma cells in the presence of dimethylsulfoxide.
 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1976.
 73(2): p. 462-6.
- 158. Zur Hausen, H., Induction of specific chromosomal aberrations by adenovirus type 12 in human embryonic kidney cells. J Virol, 1967. 1(6): p. 1174-85.
- 159. Wang, W.Z. and Z. Molnar, Dynamic pattern of mRNA expression of plasticity-related gene-3 (PRG-3) in the mouse cerebral cortex during development. Brain Res Bull, 2005. 66(4-6): p. 454-60.
- 160. Osheroff, H. and M.E. Hatten, *Gene expression profiling of preplate neurons destined for the subplate: genes involved in transcription, axon extension, neurotransmitter regulation, steroid hormone signaling, and neuronal survival.* Cereb Cortex, 2009. 19 Suppl 1: p. i126-34.
- 161. Pinon, M.C., et al., *Dynamic integration of subplate neurons into the cortical barrel field circuitry during postnatal development in the Golli-tau-eGFP (GTE) mouse*. J Physiol, 2009. 587(Pt 9): p. 1903-15.
- 162. Toth, K. and T.F. Freund, *Calbindin D28k-containing nonpyramidal cells in the rat hippocampus: their immunoreactivity for GABA and projection to the medial septum.* Neuroscience, 1992. 49(4): p. 793-805.
- 163. Gulyas, A.I., et al., Calretinin is present in non-pyramidal cells of the rat hippocampus--I. A new type of neuron specifically associated with the mossy fibre system. Neuroscience, 1992. 48(1): p. 1-27.

- 164. Hartig, W., et al., *Triple immunofluorescence labelling of parvalbumin, calbindin-D28k and calretinin in rat and monkey brain.* J Neurosci Methods, 1996. 67(2): p. 89-95.
- 165. Celio, M.R., *Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system*. Neuroscience, 1990. 35(2): p. 375-475.
- 166. Nitsch, R. and T.G. Ohm, *Calretinin immunoreactive structures in the human hippocampal formation*. J Comp Neurol, 1995. 360(3): p. 475-87.
- 167. DeFelipe, J., *Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex.* J Chem Neuroanat, 1997. 14(1): p. 1-19.
- 168. Rogers, J.H., *Calretinin: a gene for a novel calcium-binding protein expressed principally in neurons.* J Cell Biol, 1987. 105(3): p. 1343-53.
- 169. Nitsch, R., E. Soriano, and M. Frotscher, *The parvalbumin-containing nonpyramidal neurons in the rat hippocampus.* Anat Embryol (Berl), 1990. 181(5): p. 413-25.
- 170. Schwab, C., G. Bruckner, and W. Hartig, *Parvalbumin and calbindin immunoreactivity in the rat brain: a double-immunolabelling method.* Acta Histochem Suppl, 1992. 42: p. 277-81.
- 171. Bernhardt, R. and A. Matus, *Light and electron microscopic studies of the distribution of microtubule-associated protein 2 in rat brain: a difference between dendritic and axonal cytoskeletons.* J Comp Neurol, 1984. 226(2): p. 203-21.
- 172. Binder, L.I., A. Frankfurter, and L.I. Rebhun, *The distribution of tau in the mammalian central nervous system.* J Cell Biol, 1985. 101(4): p. 1371-8.
- 173. Navone, F., et al., *Protein p38: an integral membrane protein specific for small vesicles of neurons and neuroendocrine cells.* J Cell Biol, 1986. 103(6 Pt 1): p. 2511-27.
- 174. Fremeau, R.T., Jr., et al., *The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse.* Neuron, 2001. 31(2): p. 247-60.
- 175. Wojcik, S.M., et al., A shared vesicular carrier allows synaptic corelease of GABA and glycine. Neuron, 2006. 50(4): p. 575-87.
- 176. Lyck, L., et al., *Immunohistochemical markers for quantitative studies of neurons and glia in human neocortex.* J Histochem Cytochem, 2008. 56(3): p. 201-21.
- 177. Lappe-Siefke, C., et al., *Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination*. Nat Genet, 2003. 33(3): p. 366-74.
- 178. Polito, A. and R. Reynolds, *NG2-expressing cells as oligodendrocyte progenitors in the normal and demyelinated adult central nervous system.* J Anat, 2005. 207(6): p. 707-16.

- 179. Berry, M., P. Hubbard, and A.M. Butt, *Cytology and lineage of NG2-positive glia*. J Neurocytol, 2002. 31(6-7): p. 457-67.
- 180. Reynolds, R. and R. Hardy, *Oligodendroglial progenitors labeled with the O4 antibody persist in the adult rat cerebral cortex in vivo.* J Neurosci Res, 1997. 47(5): p. 455-70.
- 181. 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.
- Guo, Y., et al., How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2008. 40(5): p. 426-36.
- 183. Greenbaum, D., et al., *Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale*. Genome Biol, 2003. 4(9): p. 117.
- 184. Abrous, D.N., M. Koehl, and M. Le Moal, *Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology.* Physiol Rev, 2005. 85(2): p. 523-69.
- 185. Buhren, J., et al., Expression of the neurotrophin receptor p75NTR in medulloblastomas is correlated with distinct histological and clinical features: evidence for a medulloblastoma subtype derived from the external granule cell layer. J Neuropathol Exp Neurol, 2000. 59(3): p. 229-40.

7 Lebenslauf

Mein Lebenslauf ist aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version nicht enthalten.
Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Juniorprof. Dr. Anja Bräuer für die Bereitstellung des Themas, der notwendigen Ressourcen und vor allem ihrer Geduld und ihrer Fachkompetenz. Für mich war es nicht selbstverständlich, dass sie die Betreuung, ohne auch nur eine Sekunde zu zögern, übernommen hat.

Natürlich möchte ich mich bei allen wissenschaftlichen Mitarbeitern, Doktoranden, technischen Mitarbeitern, Zivildienstleistenden und Marni Pollrich für ihre Unterstützung und Kritik zum richtigen Zeitpunkt bedanken. Besonders bedanken möchte ich mich allerdings bei Ingo Przesdzing, der mit mir und Linda Rocha so einige lange Nächte im Labor verbracht hat. Der mich immer wieder aufheiterte und aufbaute. Des Weiteren möchte ich unbedingt Beate Geist danken, die mit ihrem Witz und ihrem "Geist" immer ein Ohr für mich hatte, egal um welche Problematik es sich handelte.

Meinen lieben Mann und besten Freund, Tobi, und meinen Eltern möchte ich danken, dass sie immer in mich vertraut haben und mir Mut und Zuspruch gaben.

Ein ganz lieber Dank gebührt vor allem Helge Müller für die Korrektur meiner Arbeit.

Selbständigkeitserklärung

"Ich, Anne Bennert, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Das Expressionsmuster von Plasticity Related Gene 3 und Plasticity Related Gene 4 im sich entwickelnden Gehirn der Ratte" selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe."

14.12.2011