

**Untersuchung axonaler
Lenkungsmechanismen im
Hippocampus der Maus in
Abhängigkeit von SRF**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen

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

von

Christin Meier
aus Greiz

vorgelegte

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

Tübingen
2011

Tag der mündlichen Prüfung:

14.12.2011

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Bernd Knöll

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Alfred Nordheim

*Man glaubt gar nicht, wie schwer es oft ist,
eine Tat in einen Gedanken umzusetzen.*

Karl Kraus

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	AXONALE LENKUNG WÄHREND DER GEHIRN-ENTWICKLUNG	1
1.1.1	<i>Mechanismen der axonalen Lenkung</i>	1
1.1.2	<i>Ephrine und deren Rezeptoren.....</i>	5
1.1.3	<i>Neurotrophine und deren Rezeptoren.....</i>	10
1.1.4	<i>Axonale Wegfindung am Beispiel des hippocampalen Systems.....</i>	13
1.2	DER <i>SERUM RESPONSE FACTOR</i> (SRF).....	19
1.2.1	<i>Der Transkriptionsfaktor SRF</i>	19
1.2.2	<i>Partnerproteine von SRF</i>	19
1.2.3	<i>Aktivierung und Regulation von SRF</i>	21
1.2.4	<i>Biologische Funktionen des Serum Response Factors</i>	24
1.3	ZIELSTELLUNG DIESER ARBEIT	32
2	MATERIAL UND METHODEN.....	33
2.1	MATERIAL.....	33
2.1.1	<i>Geräte</i>	33
2.1.2	<i>Chemikalien.....</i>	33
2.1.3	<i>Materialien und Reagenzien</i>	36
2.1.4	<i>Oligonukleotide.....</i>	53
2.1.5	<i>Antikörper</i>	55
2.1.6	<i>Plasmide.....</i>	56
2.1.7	<i>Mausstämme</i>	56
2.2	METHODEN.....	57
2.2.1	<i>Zellbiologische Methoden</i>	57
2.2.2	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	70
2.2.3	<i>Biochemische Methoden.....</i>	81
2.2.4	<i>Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen und Statistik.....</i>	83
3	RESULTATE.....	85
3.1	UNTERSUCHUNG NEUER FAKTOREN FÜR DIE AXONALE LENKUNG IM HIPPOCAMPUS DER MAUS.....	85
3.1.1	<i>Untersuchung neuer Faktoren für die axonale Lenkung auf Genexpressionsebene</i>	85
3.1.2	<i>Lokalisierung der Genexpression neuer Faktoren im Hippocampus.....</i>	88
3.1.3	<i>Untersuchung der hippocampalen Moosfaserwegfindung in Srf-defizienten Mäusen</i>	92
3.2	INTERAKTION DER EPHA- UND NEUROTROPHIN-SIGNALTRANSDUKTION IN DER AXONALEN WEGFINDUNG.....	96
3.2.1	<i>Die vorwärts gerichtete EphA-Signalweiterleitung wirkt in vitro der BDNF-induzierten Wachstumskegelmorphologie in Abhängigkeit von SRF entgegen</i>	96

3.2.2	<i>Die BDNF-induzierte Neuritenverzweigung wird durch vorwärts-gerichtete EphA-Signaltransduktion in Abhängigkeit von SRF antagonisiert</i>	99
3.2.3	<i>EphA-Signaltransduktion wirkt der BDNF-induzierten Wachstumskegelmotilität entgegen</i>	101
3.2.4	<i>Verteilung der Lenkungsmoleküle im Hippocampus</i>	106
3.2.5	<i>Ephrin-A5 und BDNF beeinflussen die Wegfindung hippocampaler Moosfasern</i>	108
3.2.6	<i>Ephrin-A5 wirkt der BDNF-Signaltransduktion durch Inhibierung der MAPK-Aktivität entgegen</i>	111
3.2.7	<i>An der Inhibierung der ERK1/2-Aktivität durch Ephrin-A5 sind Phosphatasen beteiligt</i>	113
3.2.8	<i>EphA-Signalweiterleitung blockiert BDNF-induzierte P-ERK Translokation in den Zellkern</i>	115
3.2.9	<i>P-ERK Signale kolokalisieren mit EphA-Rezeptoren</i>	118
3.2.10	<i>Kolokalisation des EphA-Rezeptors mit Ras-GAP</i>	119
3.2.11	<i>Die vorwärts gerichtete EphA-Signaltransduktion beeinflusst die BDNF-induzierte transiente Genexpression von IEGs</i>	122
3.2.12	<i>Die langandauernde vorwärts gerichtete EphA-Signaltransduktion beeinflusst die Genexpression zytoskelettaler Gene</i>	126
3.2.13	<i>Inhibierung der BDNF-vermittelten Genexpression ist spezifisch für die EphA-Rezeptoraktivierung</i>	131
3.2.14	<i>MAPK sind in die EphA-vermittelte Inhibierung der BDNF-induzierten Genexpression partiell beteiligt</i>	132
3.2.15	<i>Luziferase Reporteragenassay zur Untersuchung der Genregulation von Srf durch Ephrin-A5 und BDNF</i>	134
3.2.16	<i>Untersuchung einer möglichen Beteiligung des EphA7-Rezeptors an der Ephrin-A5/ BDNF-Interaktion</i>	139
3.2.17	<i>Die Moosfaserwegfindung ist in EphA7-deletierten Mäusen nicht gestört</i>	145
4	DISKUSSION	147
4.1	SIGNALWEITERLEITUNG DES EPHA- UND TRKB-REZEPTORS IN DER AXONALEN LENKUNG HIPPOCAMPALER NEURONE	147
4.1.1	<i>Eine Interaktion der EphA- und TrkB-Signalweiterleitung beeinflusst die Motilität hippocampaler Neurone</i>	147
4.1.2	<i>Die MAPK-Kaskade: das Bindeglied zwischen der BDNF und Ephrin-A5 Interaktion</i>	150
4.1.3	<i>Eine neue Funktion der vorwärts gerichteten EphA-Signaltransduktion: Beeinflussung der Genexpression</i>	153
4.1.4	<i>Der SRF-Kofaktor MAL als mögliches Bindeglied der EphA-BDNF-Interaktion</i>	155
4.1.5	<i>Konsequenz einer BDNF-Ephrin-A5 Interaktion auf die axonale Lenkung hippocampaler Neurone</i>	156
4.2	DIE ROLLE VON SRF IN DER HIPPOCAMPALEN ENTWICKLUNG	158
5	ZUSAMMENFASSUNG	162
6	SUMMARY	164
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	166
8	LITERATURVERZEICHNIS	170

9	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	190
10	DANKSAGUNG.....	191
11	CURRICULUM VITAE	192

1 Einleitung

1.1 Axonale Lenkung während der Gehirnentwicklung

1.1.1 Mechanismen der axonalen Lenkung

Schaut man sich das Nervensystem von Säugetierorganismen an, so ist man über den komplexen Aufbau erstaunt. Der korrekten Vernetzung und Verschaltung von Milliarden Nervenzellen liegt zuvor eine Kette von räumlich und zeitlich präzise gesteuerten biologischen Prozessen wie Proliferation, Migration, Differenzierung, Navigation, Synapsenbildung und Zelltod zugrunde. So müssen Neurone oder neuronale Vorläuferzellen zuerst oft beachtliche Wegstrecken durch embryonales Gewebe zurücklegen, bevor sie in ihrem eigentlichen Zielgebiet Nervenfortsätze, auch Neuriten genannt, ausbilden. Diese differenzieren sich schließlich zu einem Axon und Dendriten. Nun müssen die Nervenzellen mit höchster Präzision ihre Fortsätze mitunter über weite Strecken aussenden, um letztendlich Synapsen mit den entsprechenden Zielzellen auszubilden (Chilton, 2006).

Blickt man zurück in die Geschichte der Erforschung neuronaler Netzwerke, so zeigt sich, dass bereits vor über 100 Jahren eine Theorie für die Entwicklung von Nervenverknüpfungen aufgestellt wurde. So postulierte im Jahre 1893 der Mediziner Ramón y Cajal, dass die Wachstumsrichtung und die Geschwindigkeit des Wachstums der Nervenfortsätze über einen Wachstumskegel gesteuert werden. Er hatte vermutet, dass neuronale Zellen chemische Signale empfangen konnten, die eine bestimmte Richtung für das Wachstum anzeigten (Cajal, 1893).

Heutige Studien belegen, dass bei der Wegfindung axonale Lenkungsmoleküle eine unabdingbare Rolle spielen. Sie dienen dem hochmotilen und sensiblen Wachstumskegel als Wegweiser (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996). Der Wachstumskegel stellt den spezialisierten Fortsatz eines Axons dar und vereint sensorische, motorische, integrative und adaptive Funktionen, was letztendlich zu einer erfolgreichen Zielfindung des Axons führt. Diese Führungsstruktur besteht aus

einem zentralen Bereich und zwei Arten von Aktin-reichen Fortsätzen, den fingerförmig ausgestülpten Filopodien und die sich dazwischen befindlichen breiten Lamellipodien (Geraldo and Gordon-Weeks, 2009).

Mit Hilfe der in der Umgebung befindlichen Lenkungsmoleküle bahnt sich der Wachstumskegel den Weg zur Zielzelle. Leitsubstanzen können Oberflächenmoleküle sein, wie z.B. einige Semaphorine oder Ephrine. Sie können jedoch auch Bestandteile der Extrazellulären Matrix sein, so wie es z.B. bei Lamininen der Fall ist. Des Weiteren können sie von Zielzellen als lösliche Moleküle sekretiert werden, so wie z.B. einige Semaphorine, Netrine oder Neurotrophine.

Es gibt zwei Wirkungen, die die Lenkungsmoleküle auf den Wachstumskegel haben können: sie können anziehend (attraktiv) oder abstoßend (repulsiv) wirken. Dies geschieht entweder durch direkten Kontakt mit der Zielzelle oder über weitere Entfernung durch löslich sekretierte Proteine. Wie in **Abb.1.1.** beschrieben, ergeben sich daraus vier Wirkmechanismen: Kontaktattraktion, Kontaktrepulsion, Chemoattraktion und Chemorepulsion.

Neben den Lenkungsmolekülen spielen Zelladhäsionsmoleküle, wie z.B. NCAM (*neuronal cell adhesion molecule*) und Transkriptionsfaktoren wie der *Serum Response Factor* (SRF) eine maßgebliche Rolle in der axonalen Lenkung (Knoll et al., 2006; Togashi et al., 2009). Aufgrund der Bedeutung für diese Arbeit wird in einem späteren Kapitel (1.2.4.2.) noch genauer auf den Einfluss des Transkriptionsfaktor SRF auf die axonale Lenkung eingegangen.

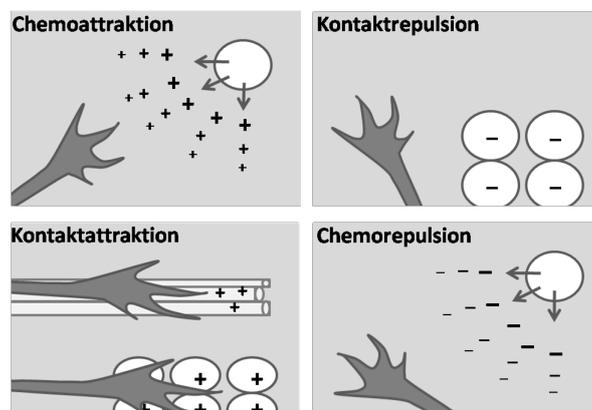


Abb. 1.1. Axonale Lenkungsmoleküle und ihre Wirkmechanismen

Die Abbildung veranschaulicht die vier Grundmechanismen der axonalen Lenkung: Chemoattraktion, Chemorepulsion, Kontaktattraktion und Kontaktrepulsion. (Goodman, 1996)

1.1.1.1 Lenkungsmoleküle und deren Rezeptoren

Erst die Entwicklung von verschiedenen *in-vitro* Assays sowie genetische Versuche ermöglichten Anfang der 80er Jahre eine Untersuchung der axonalen Lenkungsmechanismen. Die am besten charakterisierten Familien axonaler Lenkungsmoleküle stellen u.a. die Netrine, Slits und Semaphorine dar. Diese sollen im Folgenden kurz beschrieben werden. Hierbei zeigt **Abb.1.3.** eine Übersicht der Liganden und Rezeptoren dieser Familien sowie die Wirkung, welche sie auf den Wachstumskegel erzielen. Auf die große Familie der Ephrine sowie der Neurotrophine soll zu einem späteren Zeitpunkt ausführlicher eingegangen werden (siehe 1.1.2 und 1.1.3), da diese Lenkungsmoleküle wichtiger Bestandteil dieser Arbeit sind.

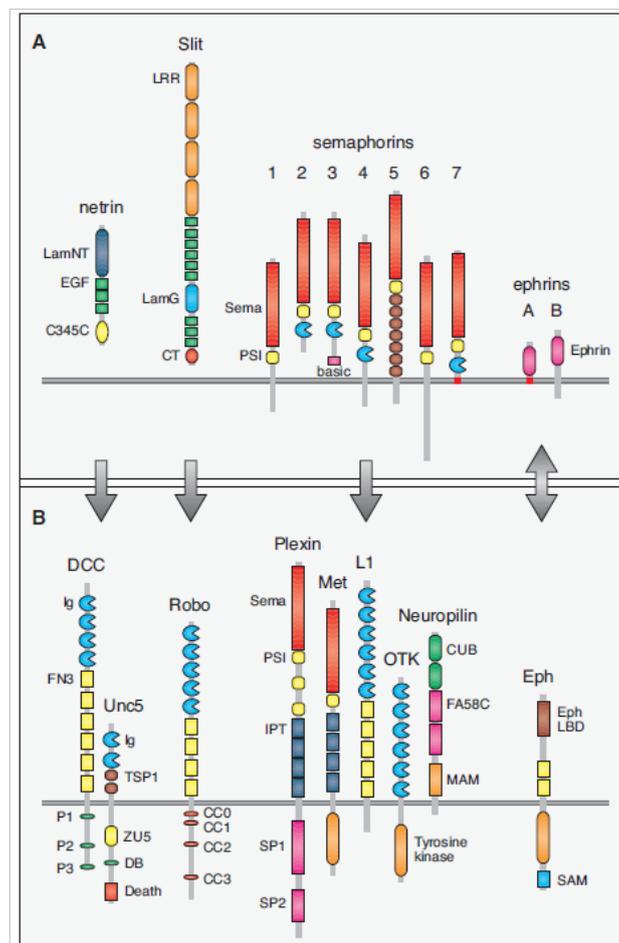


Abb.1.3. Übersicht über die bekanntesten Lenkungsmoleküle (A) und ihre Rezeptoren (B)

Chemoattraktive und repulsive Netrine binden an DCC/ Unc40 sowie Unc5-Rezeptoren. Vornehmlich repulsiv wirkende Slits interagieren mit Robo-Rezeptoren. Semaphorine agieren über Plexine und Neuropiline und wirken sowohl repulsiv als auch attraktiv. Ephrine binden an Eph-Rezeptoren und wirken primär repulsiv. (Dickson, 2002)

1.1.1.1.1 *Netrine*

Die zuerst beschriebenen Lenkungsmoleküle waren die phylogentisch hoch konservierten Netrine. Sie stellen von Zielzellen sekretierte Glykoproteine dar, die eine molekulare Verwandtschaft mit Laminin aufweisen und wurden auf der Suche nach chemoattraktiven Molekülen bei Vertebraten entdeckt (Serafini et al., 1994). Hier steuern sie das Auswachsen der Kommissuralneuronen des embryonalen Rückenmarks von der dorsalen zur ventralen Bodenplatte. Ein homologes Gen zu den Netrinen wurde in *Caenorhabditis elegans* gefunden, wo es als UNC-5 bezeichnet wird (Hedgecock et al., 1990). Abhängig von der Art der Rezeptorrekrutierung können Netrine und ihre Rezeptoren UNC-40/ DCC und UNC-5 neben dieser chemoattraktiven Wirkung auf Axone ebenso einen repulsiven Effekt haben (Hong et al., 1999).

1.1.1.1.2 *Semaphorine*

Bei der großen Gruppe der Semaphorine handelt es sich um teilweise membrangebundene wie auch teilweise sezernierte Lenkungsmoleküle, die über multimere Rezeptorkomplexe, die Neuropiline und Plexine, agieren. Semaphorine werden aufgrund ihrer Strukturunterschiede in 8 Klassen unterteilt (Kolodkin et al., 1993). Semaphorine zeigen hauptsächlich repulsive Wirkungen. So können sie z.B. *in-vitro* den Wachstumskegelkollaps auslösen (Nakamura et al., 2000). Sie sind zudem an der Wegfindung hippocampaler Moosfasern beteiligt und bewirken durch Interaktion mit dem entsprechenden Plexin-Rezeptor die Projektion des Faserbündels in die korrekte Lamina (Suto et al., 2007; Tawarayama et al., 2010). Wie für die Netrine konnte auch für die Gruppe der Semaphorine eine attraktive Wirkung auf den Wachstumskegel nachgewiesen werden (Derijck et al., 2010; Raper, 2000). Die Wirkung des Lenkungsmoleküls hängt im Wesentlichen von der Rezeptorausstattung des Wachstumskegels sowie der intrazellulären Signaltransduktion ab.

1.1.1.1.3 Slits

Die von Zielzellen sekretierten Slits (Slit1-3) agieren als lösliche Moleküle über die Robo (*Roundabout*) Rezeptorfamilie. Hierzu gehören bei den Wirbeltieren Robo1/2 und Rig-1 (Nguyen-Ba-Charvet and Chedotal, 2002). Die Slits wurden als repulsiv wirkende Lenkungsmoleküle an der Mittellinie des Rückenmarks der Vertebraten identifiziert, wo sie eine Repulsion der Axone bewirken, nachdem diese die Mittellinie gekreuzt haben. Ein erneutes Kreuzen wird somit verhindert (Kidd et al., 1999). Wie auch die Netrine sind Slits multifunktional. So konnte neben der repulsiven Wirkung dieses Lenkungsmoleküls auch ein attraktiver Effekt auf sensorische Axone gezeigt werden. Hier stimulierten aufgereinigte Slits die Ausbildung von Verzweigungen (Wang et al., 1999). Zudem wurde herausgefunden, dass Slits die attraktive Wirkung der Netrine durch Interaktion mit dem Netrin-Rezeptorkomplex aufheben können (Stein and Tessier-Lavigne, 2001).

1.1.2 Ephrine und deren Rezeptoren

Ein wichtiger Fokus wurde in dieser Arbeit auf die große Familie der Ephrine gelegt. Vor nun mehr als 50 Jahren machte der Neurobiologe Roger Sperry die Entdeckung, dass retinale Axone durch einen in der Retina und dem Tektum entgegengesetzten Gradienten von Lenkungsmolekülen ihr topographisch korrektes Ziel erreichen (Sperry, 1963). Auf der Suche nach den involvierten Molekülen stieß man auf Ephrine (Cheng et al., 1995; Drescher et al., 1995). Diese stellen membrangebundene Lenkungsmoleküle dar und werden in zwei Klassen unterteilt, die Ephrin-As und Ephrin-Bs. Die fünf Ephrine der A-Subklasse (Ephrin-A1 bis Ephrin-A5) sind durch einen GPI-Anker (Glykosylphosphatidylinositol-Anker) mit der Membran verbunden. Die drei Mitglieder der Ephrin-B-Unterklasse (Ephrin-B1 bis Ephrin B3) hingegen stellen Transmembranproteine dar. Bei den Rezeptoren der Ephrine handelt es sich um die größte Untergruppe der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs). Diese werden ebenfalls in A- und B-Klassen unterteilt (Eph Nomenclature Committee, 1997). In Säugern unterscheidet man neun Mitglieder der EphA-Subklasse (EphA1 bis EphA8 und EphA10) sowie fünf Mitglieder der EphB-Unterklasse (EphB1 bis EphB4 und EphB6). Hierbei binden Typ-A-Ephrine bevorzugter Weise an Typ-A-Rezeptoren und

Ephrin-Bs an Klasse B-Rezeptoren. Jedoch existieren hier auch Ausnahmen. Besonders hervorgehoben werden soll der Ligand Ephrin-A5, welcher mit hoher Affinität an den EphB2-Rezeptor binden und aktivieren kann (Himanen et al., 2004). Der EphA4-Rezeptor stellt eine weitere Ausnahme dar, welcher sowohl für Ephrin-As als für Ephrin-Bs eine hohe Bindekapazität aufweist (Egea and Klein, 2007; Knoll and Drescher, 2002; Pasquale, 2005).

1.1.2.1 Biologische Funktionen der Ephrin Liganden und Eph-Rezeptoren

Die Aktivierung der Eph-Rezeptoren durch ihre Liganden resultiert in einem weiten Spektrum von Funktionen. So spielen sie vor allem in der **axonalen Lenkung** eine unabdingbare Rolle (Egea and Klein, 2007), wo sie für eine korrekte Entwicklung verschiedener neuronaler Systeme unverzichtbar sind. Ein klassisches Beispiel hierfür ist die Ausprägung der topographischen Projektionen des retinotektalen Systems im Huhn (Drescher et al., 1995; McLaughlin and O'Leary, 2005). Hierbei inhibiert Ephrin als hauptsächlich repulsiv wirkendes Molekül die Ausbildung von axonalen Verzweigungen und bedingt schließlich die Retraktion der Axone in ihr korrektes Zielgebiet (Frisen et al., 1998; McLaughlin and O'Leary, 2005; Yates et al., 2001). Abhängig vom axonalen Zelltyp kann Ephrin jedoch auch einen attraktiven Effekt auf die axonale Lenkung ausüben (Knoll et al., 2001)

Neben dem zellulären Prozess der kontaktvermittelten Retraktion/Attraktion übernehmen Ephrine und ihre Rezeptoren Aufgaben in der **Faszikulierung** von Axonen (Winslow et al., 1995) sowie in der **Zellmigration** von Neuralleistenzellen (Krull et al., 1997).

Auch eine biologische Funktion in der Entstehung von Synapsen und der Regulierung **synaptischer Plastizität** konnte den Ephrinen zugewiesen werden. So konnte ein Zusammenhang der EphA-Ephrin-A-Interaktion und Synaptogenese im Hippocampus der Maus gezeigt werden (Akaneya et al., 2010), und dass die EphA-Rezeptoraktivierung zu einer Beeinflussung der Langzeitpotenzierung (LTP) im murinen Hippocampus führt (Gao et al., 1998; Grunwald et al., 2001).

Auch außerhalb des Nervensystems übernehmen Ephrine wichtige Funktionen, wie z.B. in der **Angiogenese** (Adams et al., 1999; Kuijper et al., 2007) oder bei der

Beschleunigung der **Wundheilung** in pathologischen intestinalen Epithelzellen (Hafner et al., 2005).

Zudem konnte ein Zusammenhang zwischen Ephrinen und **Tumorgnese** beschrieben werden. So wurde gezeigt, dass eine Überexpression von Ephrinen und ihren Rezeptoren eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Tumoren spielt (Dodelet and Pasquale, 2000; Li et al., 2009), was dieses Molekül zu einem attraktiven Ansatzpunkt für ein mögliches Therapeutikum in der Krebstherapie macht.

1.1.2.2 Signaltransduktion der Eph/ Ephrine

Bei den Ephrinen handelt es sich um membrangebundene Moleküle, weshalb ein direkter interzellulärer Kontakt zwischen den Ephrinen und Eph-Rezeptoren Voraussetzung für eine funktionierende Signalpropagation ist. Kennzeichnend für den Liganden/ Rezeptor-Komplex ist eine bidirektionale Signaltransduktion (siehe **Abb. 1.4.**). Durch diese Besonderheit kann eine Signalweiterleitung sowohl von der Rezeptor-exprimierenden Zelle, wie auch Liganden-exprimierenden Zelle ausgehen. Im Folgenden wird von einer vorwärts gerichteten Signaltransduktion gesprochen, sobald eine Signalweiterleitung über den Eph-Rezeptor erfolgt. Der Begriff der rückwärts gerichteten Signaltransduktion wird verwendet, wenn die Aktivierung über das Ephrin stattfindet, also der Eph-Rezeptor als Ligand agiert (Bruckner et al., 1997; Holland et al., 1996; Kullander and Klein, 2002). Hauptaugenmerk dieser Arbeit stellt die vorwärts gerichtete Signalweiterleitung dar, weshalb auf diese im Folgenden ausführlicher eingegangen wird als auf die rückwärts gerichtete Signalpropagation.

Bei der **vorwärtsgerichteten Signalkaskade**, die hauptsächlich Prozesse wie Zellmorphologie, Adhäsion und Migration reguliert, kommt es durch Ligandenbindung zu einer Autophosphorylierung des Eph-Rezeptors. Daraufhin erfolgt z.B. eine Aktivierung der GTPase Rho durch den GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) Ephexin (Shamah et al., 2001). Eine Aktivierung des Rho-Signalweges resultiert in der Bildung von Stressfasern, Deadhäsion der Zellen durch Stabilisierung des Aktinzytoskeletts und zu einer Aktin-Myosin-Kontraktion. So führt die Ephexin-vermittelte Aktivierung der RhoA-Signaltransduktion letztendlich zu

einer Inhibierung des Neuritenwachstums, einer Förderung des Wachstumskegelkollaps und der axonalen Retraktion (Dickson, 2001; Luo, 2000; Yuan et al., 2003). Auf die GTPasen Rac (verantwortlich für Bildung von Lamellipodien) und Cdc42 (führt zur Filopodienbildung) wirkt Ephexin hingegen inhibierend (Huber et al., 2003), was in einer Retraktion der Lamellipodien und Filopodien resultiert (Shamah et al., 2001).

Von großer Bedeutung ist für diese Arbeit der Einfluss von Ephrin-A auf den MAP-Kinase Signalweg. Gewöhnlich resultiert die Aktivierung des Ras-MAPK Signalweges in transkriptioneller Regulierung und einer gesteigerten Zellproliferation. Im Hinblick auf neuronale Prozesse konnte diesem Signalweg eine wichtige Rolle in der Zellmigration, dem Neuritenwachstum und der axonalen Lenkung zugeschrieben werden (Borasio et al., 1989; Forcet et al., 2002), wobei die MAP-Kinasen hier zytoskelettale Zielgene wie z.B. Mikrotubuli phosphorylieren (Gundersen and Cook, 1999). Eine Eph-Rezeptoraktivierung durch Ephrine führt jedoch, bis auf wenige Ausnahmen, vornehmlich zu einer Hemmung des Ras-MAPK-Signalweges (Elowe et al., 2001; Miao et al., 2001; Yue et al., 2008). Der molekulare Mechanismus hierfür ist bis dato nur unzureichend aufgeklärt. Das Ras GTPase-aktivierende Protein Ras-GAP gilt als möglicher Ansatzpunkt zur Klärung dieses Sachverhaltes (Tong et al., 2003). Ebenso wurde die Src-Kinase als Downstreameffektor des EphA-Rezeptors beschrieben, wobei Src einen repulsiven Effekt auf die axonale Lenkung vermittelt (Knoll and Drescher, 2004).

Des Weiteren spielt die Eph-Rezeptoraktivierung eine wichtige Rolle in der Integrin-Signalkaskade. Die Effekte sind, abhängig vom Zelltyp und des aktivierten Eph-Rezeptor, unterschiedlich. So wurde sowohl eine Hemmung der Integrinaktivität (Miao et al., 2000; Zou et al., 1999) als auch Förderung beobachtet (Nagashima et al., 2002).

Neben der gut untersuchten vorwärts gerichteten Signaltransduktion können Eph-Rezeptoren das Zellverhalten auch über den Ephrin-Liganden durch die **rückwärts gerichtete Signalweiterleitung** steuern (Henkemeyer et al., 1996; Kullander et al., 2001). Dies wird ermöglicht durch eine nicht-zellautonome Kinase-unabhängige Funktion der Eph-Rezeptoren. Dieser Vorgang ist weit weniger gut verstanden. Bekannt ist, dass die Bindung des GPI-verankerten Ephrin-A-Liganden an den korrespondierenden Rezeptor zu einer kompartimentalisierten Signaltransduktion

innerhalb von Caveolae führt. Hierbei erfolgt eine Rekrutierung und Aktivierung der Src-Kinase Fyn, was letztendlich zu einer Repulsion von Axonen führt (Davy et al., 1999; Lim et al., 2008).

Des Weiteren kann es durch die Bildung des Eph/ Ephrin-Komplexes bei der reversen EphB-Signalpropagation zu einer Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne des Ephrin-Bs kommen, was eine Signalweiterleitung ins Zellinnere ermöglicht. Dies kann dann zu einer Rekrutierung des SH2/ SH3 Adaptorprotein Grb4 (*growth factor receptor-bound protein 4*) führen, welches wiederum zu einer Beeinflussung der fokalen Adhäsionskinase (FAK) führt und letztendlich in axonaler Retraktion resultiert (Xu and Henkemeyer, 2009).

In der reversen EphA-Signalweiterleitung wurde zudem eine mögliche Beteiligung der Ephrine als „Rezeptor“ in der Ausbildung vomeronasaler Projektionen beschrieben (Knoll et al., 2001).

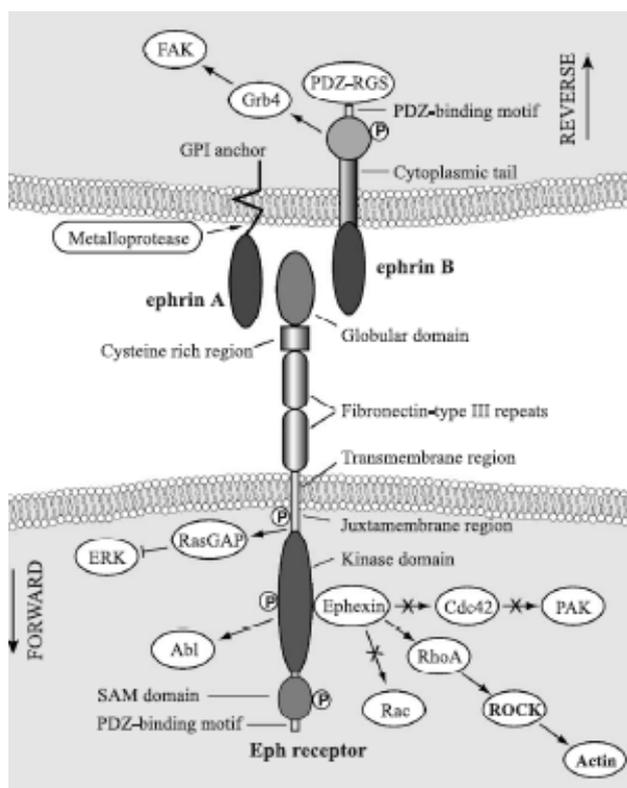


Abb.1.4. Eph/Ephrin Rezeptor Signalweiterleitung.

EphA-Rezeptoren interagieren mit GPI-verankerten Ephrin-As, EphB-Rezeptoren binden an transmembrangebundene Ephrin-Bs. Der Rezeptor-Ligand-Komplex löst bidirektionale Signale aus. Vorwärts gerichtete Weiterleitung: Der GEF Ephexin verbindet den EphA Rezeptor mit Rho GTPasen. Nach Rezeptorstimulation erfolgt ebenso eine Hemmung des MAPK-Weges (Kullander and Klein, 2002).

1.1.3 Neurotrophine und deren Rezeptoren

Neben den klassischen Lenkungsmolekülen, wie z.B. Semaphorine und Ephrine, übernehmen Neurotrophine ebenfalls eine wichtige Funktion in der axonalen Lenkung.

Neurotrophine sind Wachstumsfaktoren, welche ursprünglich durch Hemmung pro-apoptotischer Gene und Expression anti-apoptotischer Gene als Überlebensfaktoren für sensorische und sympathische Axone identifiziert wurden (Lewin and Barde, 1996; Reichardt, 2006). Neben dem Erhalt verschiedener neuronaler Populationen des peripheren und zentralen Nervensystems stehen die Neurotrophine mit weiteren Funktionen im Zusammenhang, wie Proliferation, Differenzierung, Myelinisierung, Ausbildung dendritischer Verzweigungen, Apoptose, axonaler Lenkung und synaptischer Plastizität (Arevalo et al., 2006; Huang and Reichardt, 2003). Man unterscheidet in dieser Gruppe vier Faktoren: den *nerve growth factor* (NGF), den *brain derived neurotrophic factor* (BDNF), Neurotrophin-3 (NT-3) sowie Neurotrophin-4 (NT-4). Diese Moleküle agieren über zwei Arten von Rezeptoren, zum einen sind das Rezeptortyrosinkinasen der *tropomyosin-related kinase* (Trk) Rezeptorfamilie und zum anderen der allgemeine Neurotrophinrezeptor p75^{NTR} (p75 *neurotrophin receptor*) der TNF Superfamilie. Die Interaktion der beiden Rezeptortypen kann sowohl synergistische, wie auch antagonistische Effekte auf die Zielzelle haben (Lykissas et al., 2007).

Der *brain derived neurotrophic factor* übernimmt fördernde Funktionen in der Neurogenese des Hippocampus (Zhao et al., 2008) und trägt eine Schlüsselrolle in der topographischen Kartierung des retinotektalen Systems (McLaughlin and O'Leary, 2005).

Hierbei kommt es bei Vertebraten zu einem initialen Überschießen retinaler Axone über ihr Ziel, die Terminationszone (TZ), hinaus. Innerhalb dieser TZ kommt es zur Ausbildung von Seitenverzweigungen, dem sogenannten „*Branching*“. Im weiteren Entwicklungsverlauf retrahieren die übergeschossenen Axone zurück bis zu ihrem eigentlichen Zielgebiet. Es wird angenommen, dass es durch BDNF zu dem besagten Überschießen und dem Prozess des „*Branching*“ kommt (McLaughlin and O'Leary, 2005). Zudem zeigen Forschungsergebnisse, dass eine BDNF Stimulation kortikaler Primärkulturen zu einer Aktivierung SRF-vermittelter Transkription führt (Kalita et al., 2006). Da diese Aspekte für die vorliegende Arbeit eine wesentliche

Rolle spielen, wird im Folgenden der Fokus auf dem Neurotrophin BDNF liegen. Neben den oben genannten Funktionen wird BDNF zudem mit Epilepsie und Depressionen in Verbindung gebracht (Gall and Lauterborn, 1992; Green et al., 2006).

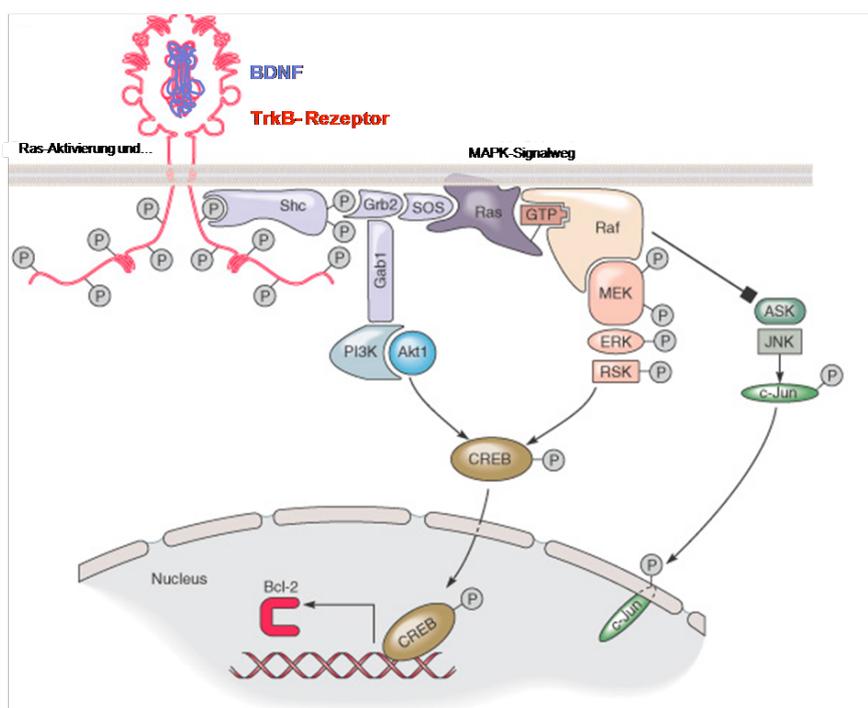
Jedes etwa 120 Aminosäuren (AS) große Mitglied der Neurotrophinfamilie entsteht durch posttranslationale Modifikationen aus einer 250 AS bestehenden Vorläuferform, der Proform. Bei BDNF spielt dies eine große Rolle, da neueste Daten der Vorläuferform proBDNF gegensätzliche Effekte zur prozessierten Form zuweisen (Koshimizu et al., 2009; Xu et al., 2011).

1.1.3.1 Signaltransduktion nach BDNF- Aktivierung

Die Familie der Trk-Rezeptoren umfasst drei Mitglieder, namentlich TrkA, TrkB und TrkC. Trotz der hohen Homologie ihrer extrazellulären Domäne weisen die einzelnen Trk-Rezeptoren in der Regel eine spezifische Affinität zu nur einem Neurotrophin auf. So werden die BDNF induzierten Signalwege hauptsächlich über TrkB-Rezeptoren vermittelt (Huang and Reichardt, 2003; Klein et al., 1991). Hierbei bindet das Neurotrophin an den Rezeptor, was zu einer Rezeptordimerisierung mit anschließender Transphosphorylierung führt, wodurch weitere Adaptermoleküle rekrutiert werden können und verschiedene Signalwege aktiviert werden (siehe **Abb. 1.5**). So konnte gezeigt werden, dass neuronales Überleben und Differenzierungsprozesse hauptsächlich auf die Aktivierung des Ras-MAPK-Weg zurückzuführen sind (Bonni et al., 1999; Kalita et al., 2006). Durch Rezeptoraktivierung werden Shc (*SH2-containing collagen-related proteins*) und Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) rekrutiert, die ihrerseits den Guanosinnukleotidaustauschfaktor GEF und Guanosintriphosphataktivierungsprotein (GAP) aktivieren. An Ras gebundenes inaktives Guanosindiphosphat (GDP) wird nun in aktives Guanosintriphosphat (GTP) überführt, woraufhin im Folgenden durch aktiviertes Ras eine Aktivierung der MAP-Kinasen erfolgt.

Neben dem MAPK-Weg wird neuronales Überleben während der embryonalen Entwicklung ebenso über die PI3-Kinase reguliert. Aktivierte Trk-Rezeptoren rekrutieren Grb2, was zu einer Aktivierung der PI3-Kinase und folglich auch Akt führt.

So kann Akt u.a. weitere Kinasen aktivieren, die zu einer zusätzlichen Phosphorylierung von Bad (proapoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie) führen. Dies resultiert in einer Inaktivierung von Bad und fördert somit neuronales Überleben. Auch auf transkriptioneller Ebene kann der PI3K-Akt und MAPK-Signaltransduktion neuronales Überleben fördern. So resultiert die Aktivierung beider Signalwege in der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB (*cyclic response element binding protein*), welcher nach Translokation in den Zellkern die Expression antiapoptotischer Gene, wie z.B. *Bcl-2* erhöht. Am Wachstumskegel der Axone kann Akt zu einer Inaktivierung der GSK-3 β (Glykogen-Synthase Kinase 3) führen, was letztendlich in axonalem Wachstum wie auch der Ausbildung von axonalen Seitenverzweigungen resultiert (Arevalo and Wu, 2006). Zudem kann eine Neurotrophin-induzierte Rezeptorstimulation zu einer Aktivierung der Phospholipase C γ (PLC) führen (Huang and Reichardt, 2003).



Copyright © 2006 Elsevier, Inc.

Abb.1.5. Trk- Rezeptor vermittelte Signalwege.

Neurotrophine binden an den TrkB- Rezeptor, was zu seiner Aktivierung und Rekrutierung verschiedener Proteine an einer spezifischen Phosphorylierungsseite in der zytoplasmatische Domäne des Rezeptors führt. Diese Interaktionen lösen die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden aus, wie die Ras, Rap, PI3K und PLC γ Signalwege. Dies resultiert in neuronalem Wachstum, Überleben und synaptischer Plastizität.

©2006 Elsevier, Inc

1.1.4 Axonale Wegfindung am Beispiel des hippocampalen Systems

Das zeitlich und räumlich abgestimmte Zusammenspiel einer Vielzahl biologischer Prozesse, wie z.B. axonale Wegfindung durch attraktive und repulsive Lenkungsmoleküle, Regulation von Transkriptionsfaktoren und Zelladhäsionsmolekülen, ermöglicht den Aufbau funktionierender neuronaler Netzwerke. Um diese funktionelle Integrität zu gewährleisten, müssen Axone, bzw. axonale Faserbündel oft getrennt von ihren Zellkörpern in zellspezifischen kompakten Schichten angeordnet sein (Forster et al., 2006). Dieser Vorgang wird Laminierung genannt und bestimmt in Vertebraten maßgeblich den Aufbau des Gehirns u.a. des Kortexes. Der Hippocampus gehört zum phylogenetisch ältesten Teil des zerebralen Kortex und ist deshalb im Gegensatz zum komplex aufgebauten 6-schichtigen Neokortex mit nur drei Schichten wesentlich einfacher aufgebaut. Das macht den Hippocampus zu einem idealen Modellsystem, welches für die Untersuchung synaptischer Plastizität und axonaler Wegfindungsprozesse sehr gut etabliert ist.

1.1.4.1 Funktionen und Aufbau des Hippocampus

Als Teil des limbischen Systems ist der Hippocampus maßgeblich für das Lernen, Gedächtnis, Emotionen und die räumliche Orientierung verantwortlich (Li and Pleasure, 2010)

Der Hippocampus kann prinzipiell in drei Areale aufgeteilt werden, den Gyrus dentatus (DG), die CA-Region (*Cornu ammonis*, mit den Teilregionen CA1- 4) und das Subiculum (siehe **Abb. 1.6.**). Die Hauptzellen des Gyrus dentatus sind überwiegend erregende Körnerzellen, deren Zellkörper sich im kompakten Zellkörnerverband (*Stratum granulare*) befinden. Die Dendriten der Körnerzellen terminieren in der Molekularschicht, welche sich nach außen an das *Stratum granulare* angliedert. Unterteilt wird diese Schicht in eine innere (*inner molecular layer*, iml) und äußere (*outer molecular layer*, oml) Molekularschicht (siehe **Abb. 1.6.**). Die Axone der Körnerzellen bilden sogenannte Moosfasern (dargestellt durch blaue Linien in **Abb. 1.6.**), die sich in Bündeln zusammenfinden. Hierbei erfolgt die Ausbildung eines kürzeren Faserbündels (infrapyramidaler Trakt) und längeren Faserbündels (suprapyramidaler Trakt), wobei der infrapyramidale Trakt im *Stratum*

oriens und der suprapyramidaler Trakt im *Stratum lucidum* terminiert. Hier bilden sie Synapsen mit den Dendriten der Pyramidenzellen aus. So erfolgt also unter normalen Bedingungen niemals ein Eintreten der Moosfaseraxone in das *Stratum pyramidale*. Unter pathologischen Bedingungen hingegen, wie z.B. bei der Epilepsie, wird eine solche Fehlleitung beobachtet (Ben-Ari and Represa, 1990; Mathern et al., 1996; Nadler, 2003).

Die Hauptzellen der CA-Region stellen Pyramidenzellen dar, deren Zellkörper sich in einer ebenfalls kompakten Zellkörperschicht (*Stratum pyramidale*) befinden. Die Zellkörperschicht wird innen sowie auch außen von Eingangsschichten umgeben. Sowohl an die innere Schicht (*Stratum oriens*) als auch an die beiden äußeren Schichten (*Stratum lacunosum-moleculare* und *Stratum radiatale*) werden die Dendriten der Pyramidenzellen versendet.

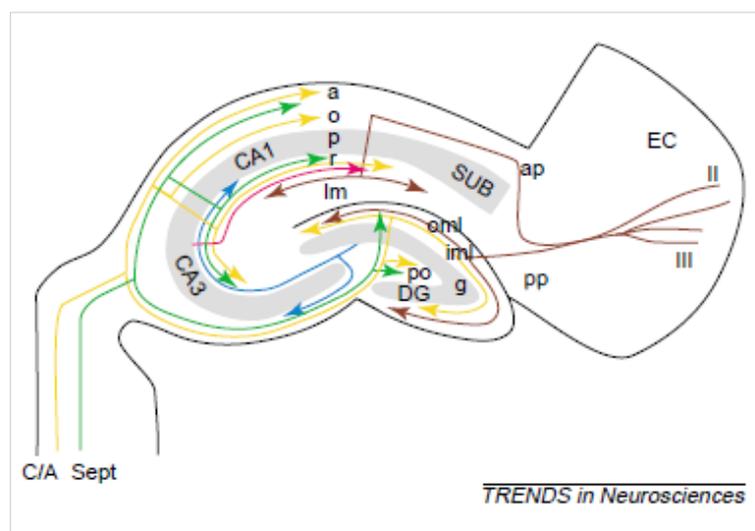


Abb. 1.6. Aufbau des Hippocampus. Vereinfachtes Schema der wichtigsten erregenden Bahnen.

Kortikale Afferenzen (EC-Fasern) sind braun dargestellt. Diese innervieren die äußere Molekularschicht (*outer molecular layer*, oml) des Gyrus dentatus (DG). Erregende kommissural/ assoziative Fasern (C/A) sind gelb dargestellt. Diese Projektionen entspringen den Moosfasern des ipsi- und kontralateralen Hilus (polymorphe Schicht, po) und terminieren in der inneren Molekularschicht (iml) des DG. Das Moosfasersystem ist blau dargestellt. Diese Fasern verknüpfen den DG mit der CA3-Region. Schaffer-Kollaterale sind pink dargestellt. Diese Fasern verbinden die CA3-Region mit der CA1-Region.

o = *Stratum oriens*, p = *Stratum pyramidale*, Im = *Stratum lacunosum-moleculare*, r = *Stratum radiatum* SUB = Subiculum, CA-Region (Ammonshorn, *Cornu ammonis*) (Skutella and Nitsch, 2001)

1.1.4.2 Verschaltung des Hippocampus

Die drei Areale des Hippocampus (Gyrus dentatus, Ammonshorn und Subiculum) sind untereinander und mit anderen Teilen des Gehirns durch verschiedene Fasertrakte verschaltet. Die wichtigsten dieser Bahnen sind im Folgenden kurz erläutert. Externe Eingangsmeldungen erhält der Hippocampus über Afferenzen aus dem entorhinalen Cortex (EC). Diese EC-Fasern, auch *Tractus perforans* genannt, projizieren auf die Dendriten der Körnerzellen in der äußeren Molekularschicht. In der inneren Molekularschicht terminieren kommissural/ assoziative Projektionen (C/A- Fasern), welche in der **Abb. 1.6.** durch gelbe Linien dargestellt sind. Diese Fasern entspringen hauptsächlich den Mooszellen aus der ipsilateralen (der gleichen Gehirnhälfte) und kontralateralen (der gegenüber liegenden Gehirnhälfte) polymorphen Schicht, auch Hilus genannt. Die bereits oben erwähnten Moosfasern der Körnerzellen verbinden den Gyrus dentatus mit den Pyramidenzellen der CA3-Region (Skutella and Nitsch, 2001).

Innerhalb der CA-Region projizieren die Schaffer-Kollateralen (dargestellt durch pinke Linie in **Abb. 1.6.**) die Pyramidenzellen der CA3-Region auf die der CA1-Region. Das Moosfasersystem und die Schaffer-Kollateralen stellen die wichtigsten Bahnen für den internen Informationsaustausch des Hippocampus dar (Skutella and Nitsch, 2001). Zusammen mit den Projektionen des *Tractus perforans* bilden sie den sogenannten trisynaptischen Schaltkreis (Amaral and Witter, 1989).

1.1.4.3 Hippocampale Neurogenese

Die Entwicklung von Neuronen aus neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen wird als Neurogenese bezeichnet. In den meisten Teilen des adulten Gehirns erfolgt die Geburt der Neurone zu einem bestimmten Zeitpunkt während der embryonalen Entwicklung und ist dann damit abgeschlossen. Die Körnerzellen der Subgranulären Zone (SGZ) des Gyrus dentatus (DG) werden hingegen auch noch während der ganzen adulten Phase generiert. Dies ist im Säugetierhirn in nur einem weiteren Hirnbereich zu beobachten: in der Subventrikulären Zone (SVZ) der lateralen Ventrikel. Die adulte Neurogenese wird durch diverse physiologische und pathologische Prozesse reguliert, wie z.B. die Proliferation adulter neuronaler

Stammzellen (NSCs, *neural stem cells*) oder Vorläuferzellen (NPCs, *neural progenitor cells*), wie auch die Reifung und Integration neugeborener Neurone (Li and Pleasure, 2010). Daran beteiligt sind u.a. Wachstumsfaktoren, wie z.B. BDNF und Neurotransmitter, welche ihrerseits die Expression proneuraler Gene wie NeuroD1 fördern (Zhao et al., 2008). Der Prozess der hippocampalen Neurogenese erfolgt in drei Phasen: der Embryonalphase, der postnatalen Phase und adulten Phase. In der ersten embryonalen Phase wird das Neuroepithelium des Gyrus dentatus definiert. Hierbei migrieren NPCs aus dem primären Neuroepithelium, um dort die sogenannte sekundäre Matrix des DG (*secondary dentate matrix, sdm*) zu generieren. Am Ende der Embryonalphase formen NPCs die äußere Körnerzellschicht (*outer granule cell layer, OGCL*) (siehe Abb. 1.7. A). In der postnatalen Phase kommt es zu einer Migration der Neurone der sekundären Matrix und damit zur Ausbildung einer tertiären Matrix (tdm). Neurone dieser Matrix migrieren nun radial, um die innere Körnerzellschicht zu generieren (*inner granule cell layer, IGCL*) (siehe Abb. 1.7. B). In der dritten und letzten Phase der Neurogenese des Gyrus dentatus differenzieren sich die Körnerzellen und es kommt zu einer Akkumulation proliferativer Zellen im Hilus, auch Subgranuläre Zone (SGZ) genannt. Dort sind sie die Quelle neuer Körnerzellen während der adulten Phase (Altman and Bayer, 1990; Li and Pleasure, 2005; Piatti et al., 2006).

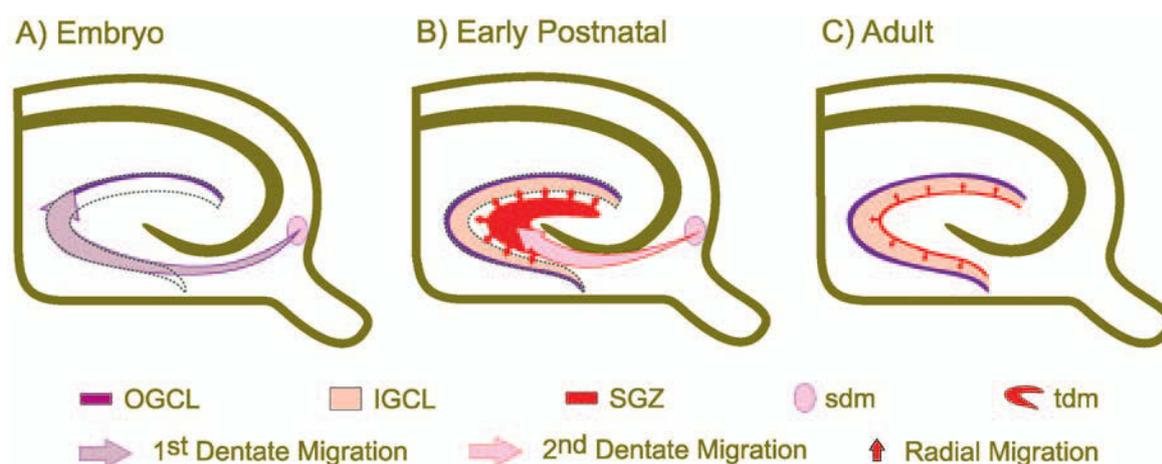


Abb. 1.7. Migration und Verteilung von Körnerzellen während der Entwicklung.

(A) Embryonale Phase: Bildung des primären Neuroepithelium und Formation der sekundären Matrix des DG (sdm). Am Ende dieser Phase wird die äußere Körnerzellschicht (OGCL) gebildet. **(B)** Postnatale Phase: Ausbildung einer tertiären Matrix (tdm). Es erfolgt eine radiale Migration und anschließende Ausbildung der inneren Zellkörnerschicht (IGCL). **(C)** Differenzierung der Körnerzellen. Ein Pool von NPCs liegt nun akkumuliert im Hilus des Hippocampus vor zur Generierung neuer Körnerzellen. (Piatti et al., 2006)

1.1.4.4 Entwicklung hippocampaler Moosfaserprojektionen

Wie unter 1.1.4.2 beschrieben, bilden die Axone der Körnerzellen Faserbündel, die sogenannten Moosfasern. Diese bilden mit den Dendriten der CA3-Pyramidenzellen Synapsen aus, wobei die Fasern stets durch einen schmalen Streifen der CA-Region, dem *Stratum lucidum*, laufen. Bei der Moosfaserentwicklung ist besonders interessant, dass das untere infrapyramidale Faserbündel (IPB) zu Beginn seiner Entwicklung über das eigentliche Ziel, die spätere Terminationszone, hinauswächst. Im Laufe der Entwicklung kommt es dann zu einer Retraktion der übergeschossenen Axone bis die Terminationszone erreicht ist (siehe **Abb. 1.8.**). Dieser Prozess des axonalen „*Prunings*“ ist auch für andere Systeme sehr gut beschrieben, wie z.B. die topographische Kartierung des retinotektale Systems oder die Entwicklung neuromuskulärer Verbindungen (Luo and O'Leary, 2005).

Es wird deutlich, dass für den komplexen Vorgang der korrekten Moosfaserentwicklung ein einzelner Faktor nicht in Betracht gezogen werden kann. Vielmehr konnte durch Verwendung diverser Mausmutanten gezeigt werden, dass die exakte zeitliche und räumliche Orchestrierung verschiedenster axonaler Lenkungsmoleküle und ihrer Rezeptoren, aber auch von Zelladhäsionsmolekülen und Transkriptionsfaktoren für eine adäquate Moosfaserwegfindung von Bedeutung sind (Chedotal and Richards, 2010; Dickson, 2002; Knoll and Nordheim, 2009).

Durch die Etablierung verschiedener Mausmutanten konnten Moleküle identifiziert werden, die während der Entwicklung im *Pruning*-Prozess involviert sind. Unter den Lenkungsmolekülen spielen dabei die Semaphorine und ihre Rezeptoren eine essentielle Rolle (Faulkner et al., 2007). So führt die genetische Deletion des Neuropilinrezeptors Npn-2, des Plexinrezeptors PLXA3 und des Liganden Semaphorin 3F zu einem Defekt in der Rückbildung des IPB (Bagri et al., 2003; Chen et al., 2000; Sahay et al., 2003)

Auch Ephrine und ihre Rezeptoren sind maßgeblich an der Moosfaserentwicklung beteiligt. So blieb in der adulten Entwicklungsphase durch Störung des Liganden/Rezeptorkomplexes die erwartete Retraktion des infrapyramidalen Bündels aus (Martinez et al., 2005).

Zudem weisen erste Daten auf einen entwicklungspezifischen Wechsel axonaler Wegfindungsmechanismen. Es wird vermutet, dass die frühe Entwicklungsphase der

Moosfasern durch Gradienten chemoattraktiver Lenkungsmoleküle dominiert ist, wohingegen ein Wechsel zur kontaktvermittelten Wegfindung in späteren Entwicklungszeitpunkten stattfindet (Koyama et al., 2004).

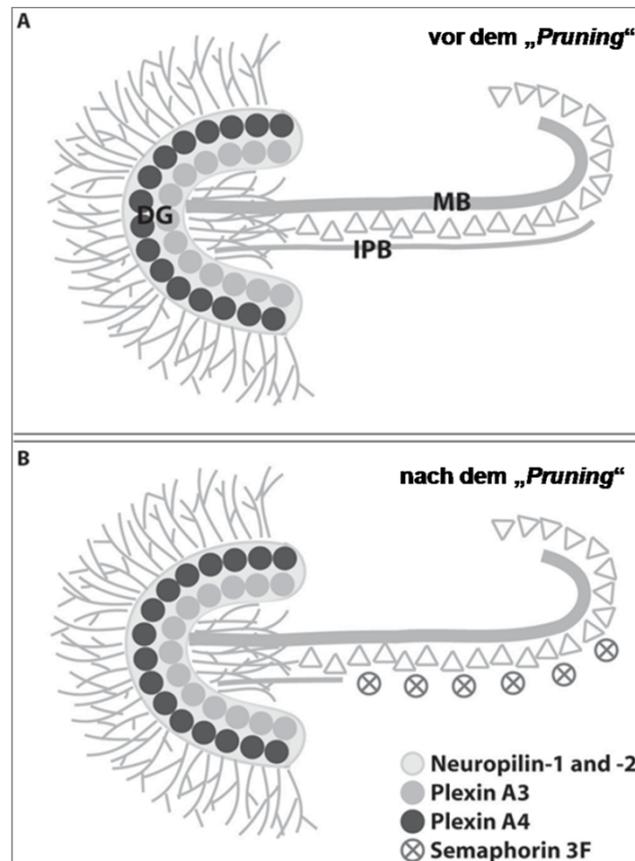


Abb. 1.8. Entwicklung des infrapyramidalen Bündels.

(A) In frühen Entwicklungsstadien (P0-P15) kommt es zu einem Überschießen des infrapyramidalen Bündels (IPB) über die eigentliche Terminationszone.

(B) In späteren Entwicklungsstadien (P15-P45) kommt es zu einer Retraktion des IPB zur Terminationszone. Maßgeblich beteiligt sind Semaphorine und ihre Rezeptoren. Näheres siehe Text.
nach (Faulkner et al., 2007)

1.2 Der Serum Response Factor (SRF)

1.2.1 Der Transkriptionsfaktor SRF

Der ubiquitär exprimierte *Serum Response Factor* (SRF) stellt einen phylogenetisch hoch konservierten Transkriptionsfaktor dar (Norman et al., 1988), welcher u. a. essentielle Funktionen in der Regulation von Zellproliferation, Zelldifferenzierung sowie neuronaler Entwicklung übernimmt (Knoll and Nordheim, 2009; Miano, 2010; Olson and Nordheim, 2010). SRF ordnet sich in die Familie der MADS-Box-Proteine ein, wobei sich die Abkürzung MADS aus den Anfangsbuchstaben der ersten identifizierten Mitgliedern MCM1 (*Saccharomyces cerevisiae*), Agamous (*Arabidopsis thaliana*), Deficiens (*Antirrhinum majus*) und SRF (*Homo sapiens*) ableitet. Alle Mitglieder dieser Proteinfamilie besitzen innerhalb der DNA-Bindestelle ein evolutionär hoch konserviertes, 56 Aminosäuren umfassendes Strukturmotiv, welches als MADS-Box bezeichnet wird. Innerhalb dieser ist der N-terminale Bereich maßgeblich für die DNA-Bindungsspezifität, während der C-terminale Abschnitt für die Dimerisierung benötigt wird (Shore and Sharrocks, 1995). Alle Gene die von SRF reguliert werden, sind im Besitz einer konservierten palindromischen Sequenz innerhalb des *serum response element* (SRE) (Treisman, 1986). SRF bindet als Homodimer an diese als CArG-Box (für *C*ytosin *A*denosin *r*ich *G*uanosin) bezeichnete DNA-Konsensussequenz, welche das Kernmotiv CC(A/T)₆GG besitzt (Sun et al., 2006; Treisman, 1986). Genomweite Analysen haben bis dato zu der Entdeckung von weit mehr als hundert CArG-Box besitzenden SRF-Zielgenen beigetragen (Stritt et al., 2009; Sun et al., 2006). Hierzu zählen hauptsächlich zytoskelettale Gene, wie z.B. *Actn*, *Actn*, *Tpm* und *Gsn* und *immediate early genes* (IEGs), wie z.B. *c-fos*, *Egr-1*, *Egr-2* und *Arc*.

1.2.2 Partnerproteine von SRF

Als ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor übernimmt SRF eine Vielzahl von Funktionen in verschiedensten biologischen Prozessen (Ausführlicheres zu den Funktionen von SRF siehe 1.2.4). Um dies zu erreichen, also eine signalspezifische

Genexpression zu erhalten, interagieren Transkriptionsfaktoren mit verschiedenen Partnerproteinen, so auch SRF.

Die Familie der *ternary complex factors* (TCF) mit ihren drei Mitgliedern Elk-1 (*Ets-like transcription factor 1*), Sap-1 (*SRF accessory protein 1*) und Net (*new ets transcription factor*) stellen hierbei eine der bekanntesten Familien von SRF-Partnerproteinen dar (Dalton et al., 1993; Giovane et al., 1994). Sie gehören zur Unterfamilie der Ets-Transkriptionsfaktoren (*E-twenty six*) und besitzen neben einer SRF-Bindestelle auch eine Ets-DNA-Bindestelle. Mit letzterer binden TCFs an eine charakteristische Kernsequenz, auch *Ets binding site* (EBS) genannt, welche sich 5' benachbart zur CARG-Box befindet (Buchwalter et al., 2004). Die CARG-Box und EBS bilden zusammen das *serum response element* (SRE), welches Bestandteil vieler Promotoren ist (z.B. IEGs, wie *c-fos* und *Arc* oder zytoskelettaler Gene, wie *Tpm*, *Flna*). SRF bindet an die CARG-Box und interagiert als Homodimer mit der Ets-DNA-Bindedomäne der TCFs, was zur Bildung eines Ternär-Komplexes führt (Shore and Sharrocks, 1994).

Eine Aktivierung dieser SRF-Partnerproteine erfolgt durch mitogen-aktivierte Proteinkinasen (Besnard et al., 2011).

Eine zweite Gruppe von SRF-Koaktivatoren stellen die *myocardin-related transcription factors* (MRTFs) dar. Zu dieser Gruppe gehören das spezifisch in Herzmuskel- und glatten Muskelzellen vorkommende Myocardin und die ubiquitär exprimierten Proteine MAL (*megakaryocytic leukaemia*, auch als MRTF-A oder MKL1 bezeichnet) und MRTF-B (*megakaryoblastik leukemia 2*, auch MKL2 genannt) (Wang et al., 2001; Wang et al., 2002; Wang et al., 2003). Der Kofaktor MAL spielt hierbei eine wichtige Rolle, da er stark in Neuronen exprimiert wird und u.a. durch das Lenkungsmolekül BDNF aktiviert wird (Kalita et al., 2006). Die Aktivität von MAL und MRTF-B wird primär über einen Signalweg durch Rho-GTPasen und monomerem Aktin reguliert, welcher in 1.2.3. ausführlicher beschrieben wird (Cen et al., 2004; Miralles et al., 2003).

1.2.3 Aktivierung und Regulation von SRF

Der *Serum Response Factor* kann generell durch verschiedene Stimuli, wie z.B. Serum, Lyso-phosphatidsäure (LPA), Tumor-Nekrose-Faktor- β (TNF β) und Antioxidantien aktiviert werden (Chai and Tarnawski, 2002). Die Aktivierung von SRF in Neuronen erfolgt durch Wachstumsfaktoren, wie z.B. BDNF und NGF oder durch neuronale Aktivität, welche z.B. durch Glutamat oder KCl induziert wird (Bading et al., 1993; Knoll and Nordheim, 2009; Misra et al., 1994; Wickramasinghe et al., 2008). In allen Fällen führt die Aktivierung des *Serum Response Factors* zu einer Transkription diverser SRF-Zielgene.

Die Regulierung der SRF-Aktivität findet prinzipiell über zwei verschiedene Mechanismen statt. Zum einen erfolgt dies über den klassischen TCF-abhängigen Signalweg und zum anderen über den TCF-unabhängigen Mechanismus, vermittelt durch Rho/MRTFs/Aktin. (Johansen and Prywes, 1994; Posern and Treisman, 2006) (siehe **Abb. 1.9.**).

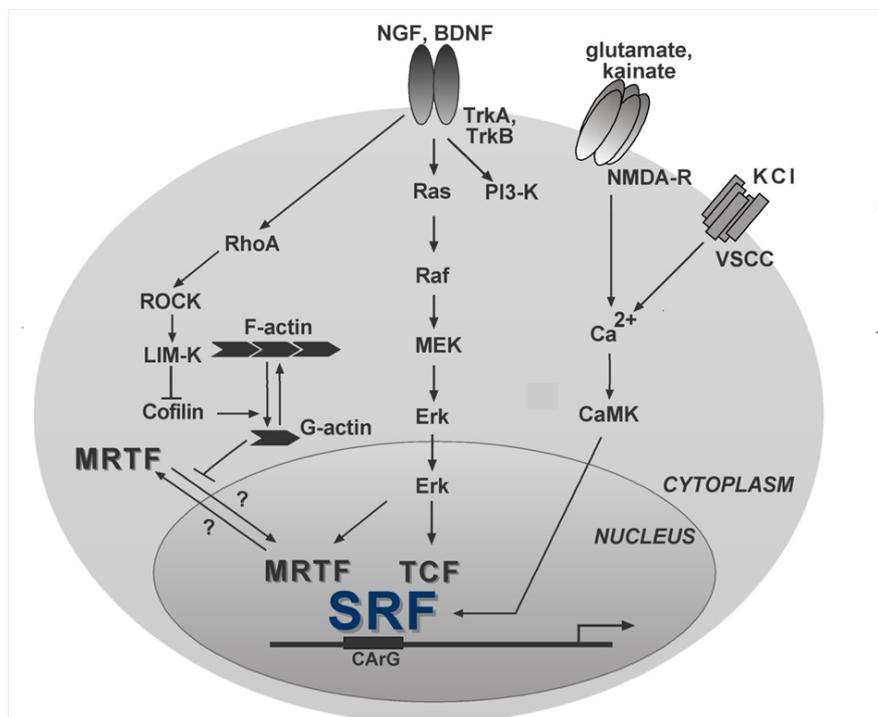


Abb. 1.9. Regulierung der Transkription durch SRF.

SRF wird in Neuronen durch verschiedene Stimuli wie z.B. Wachstumsfaktoren (NGF, BDNF) oder über neuronale Aktivität aktiviert. SRF und seine Ko-Faktoren MRTF und TCF können über die MAPK-, Rho/Aktin- sowie CamK-Signalwege aktiviert werden. Der Shuttle von MRTF/ MAL zwischen Zytoplasma und Zellkern ist in Neuronen noch umstritten (gekennzeichnet durch Fragezeichen). (Knoll and Nordheim, 2009)

1.2.3.1 Aktivierung von SRF über MAP-Kinasen

Die TCF-abhängige Aktivierung von SRF (siehe Abb. 1.9.) erfolgt durch MAP-Kinasen und ist primär von Bedeutung bei der Regulierung der IEGs z.B. *c-fos* und *Egr1*. Zu den Effektorinasen zählen ERK (*extracellular regulated Kinase*), JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) und p38/SAPK (*stress activated kinase*), welche die TCFs phosphorylieren und dadurch aktivieren. Durch die MAPK- vermittelte Phosphorylierung der TCFs kommt es zu folglich zu einer Konfirmationsänderung im ternären Komplex. Dadurch können weitere Koaktivatoren wie z.B. CBP (*cAMP response element binding protein*) oder p300 rekrutiert und Korepressoren wie z.B. Histondeacetylase-Komplexe inaktiviert werden, was folglich zu einem Transkriptionsstart führt (Li et al., 2003; Ramirez et al., 1997; Yang and Sharrocks, 2004).

1.2.3.2 Aktivierung von SRF über RhoA/ MRTFs/ Aktin

Der zweite Mechanismus zur Regulierung der SRF-Aktivität erfolgt über die Aktivierung der kleinen GTPase RhoA, monomeres Aktin sowie die Mitglieder der MRTF-Familie, namentlich MRTF-A/ MAL und MRFT-B (Hill et al., 1995; Posern and Treisman, 2006). Dieser Signalweg ist besonders bei der Regulierung zytoskelettaler Gene (z.B. *Aktin*, *Zyxin*) und muskelspezifischer Gene (z.B. *Myo D*, *Myogenin*) von Bedeutung. Durch Aktivierung von RhoA werden zwei Effektorsignalwege aktiviert: der ROCK1-LIM Kinase-Cofilin Signalweg, welcher in einer Stabilisierung von F-Aktin resultiert und der mDia-Signalweg, welcher zu einer gesteigerten Polymerisation des F-Aktins führt (Geneste et al., 2002). Durch ROCK1 (*Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1*) kommt es hierbei zu einer Aktivierung der LIM-Kinase, was wiederum zur Inhibierung des Aktin- depolymerisierende Protein Cofilin führt und folglich in einer F-Aktin Stabilisierung resultiert. Die Aktivierung von mDia (*mammalian Diaphanous-related formins*) hingegen führt zu einer gesteigerten Polymerisation des F-Aktins. Beides führt zu einer starken Abnahme des G-Aktin Anteils, was folglich in einer Gleichgewichtsverschiebung von globulärem G-Aktin zu filamentösem F-Aktin innerhalb der Zelle resultiert, und zur Ausbildung von Stressfasern führt. In unstimulierten, nicht neuronalen Zellen ist MRTF/ MAL im Zytoplasma an G-Aktin gebunden. Als Konsequenz der G-Aktin Abnahme, wird der Kofaktor nicht länger an globuläres Aktin gebunden. Daraufhin kann dieser in den

Zellkern translozieren, dort mit SRF assoziieren und eine SRE-aktivierte Transkription vermitteln (Settleman, 2003). Der für die Transkription elementare Prozess von Import und Export der MRTF/ MAL zwischen dem Zytosol und dem Zellkern ist jedoch nur ungenügend geklärt und ist in Neuronen noch umstritten (Knoll and Nordheim, 2009).

1.2.3.3 Interaktion des TCF- und RhoA/ MRTFs/ Aktin- Signalweges

TCFs und MRTFs konkurrieren um dieselbe Bindestelle an SRF, da es SRF nicht möglich ist mit beiden Kofaktoren gleichzeitig zu interagieren (Posern and Treisman, 2006). Dennoch belegen kürzlich veröffentlichte Daten, dass der TCF- und RhoA/ MRTF-Signalweg nicht zwangsläufig voneinander getrennt verlaufen, sondern miteinander interagieren (Kalita et al., 2006; Muehlich et al., 2008), wobei es noch einer Aufklärung des sich dahinter befindlichen molekularen Mechanismus bedarf. So konnte die Gruppe um Kalita eine TCF-unabhängige Aktivierung von SRF über den Kofaktor MAL in Neuronen zeigen. Hierbei führte die Stimulation mit dem neurotrophen Lenkungsmolekül BDNF zu einer Aktivierung der MAPK ERK1/2, welche durch einen noch ungeklärten Mechanismus MAL aktiviert und letztendlich in einer SRF-vermittelten Transkription resultiert (Kalita et al., 2006). Des Weiteren wurde in nicht-neuronalen Zellen gezeigt, dass eine Aktivierung von RhoA, wie oben erläutert, zu einer Abnahme von G-Aktin führt, was zu einem Kernimport von MAL führt. Währenddessen wird das sich im Nukleus befindliche MAL durch ERK1/2 phosphoryliert, an G-Aktin gebunden und anschließend aus dem Zellkern exportiert. Dies resultiert in einer verringerten Menge an freien MAL, welches wiederum an SRF binden und Transkriptionsvorgänge aktivieren kann (Muehlich et al., 2008) (siehe Schemata in **Abb. 1.10**).

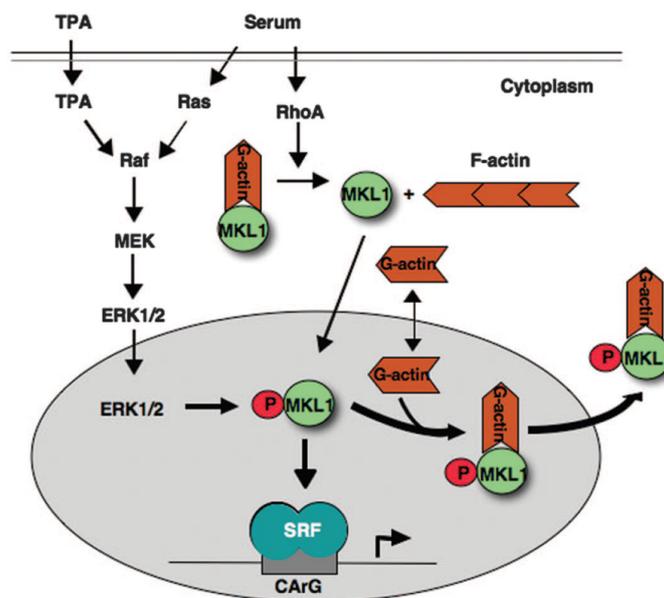


Abb. 1.10. Modell der Regulierung von MAL/ MKL1.

Seruminduktion resultiert in einer Aktivierung der RhoA- sowie Ras/MAPK-Signalkaskade. RhoA-Aktivierung führt zur MAL/MKL1 Kernlokalisierung aufgrund Stressfaserbildung und sinkender G-Aktinmenge. Währenddessen phosphoryliert ERK1/2 MAL und führt zur G-Aktinbindung und zum Kernexport. Nun steht weniger freies MAL für die SRF-vermittelte Transkription zur Verfügung (Muehlich et al., 2008).

1.2.4 Biologische Funktionen des *Serum Response Factors*

1.2.4.1 Nicht-neuronale Funktionen von SRF

Da TCFs und MRTFs/ MAL um dieselbe Bindestelle an SRF konkurrieren, kann eine SRF-vermittelte Genexpression differentiell in den verschiedensten biologischen Prozessen kontrolliert werden. Folglich übernimmt der ubiquitär exprimierte Transkriptionsfaktor auch weitumfassende Funktionen.

In murinen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) führt die Deletion von SRF zu Beeinträchtigungen in Zelladhäsion, Zellausbreitung und Zellmigration. Dies wurde bedingt durch die verminderte Expression fokaler Adhäsionsproteine, wie die fokale Adhäsionskinase (FAK), β -Integrin, Talin, Zyxin und Vinculin (Schratt, 2002). Ebenso konnte gezeigt werden, dass in SRF-defizienten ES-Zellen die Expressionsmenge des Gesamtaktins und der IEGs erniedrigt ist. Dadurch ist eine adäquate Aktinpolymerisation nicht mehr gewährleistet (Schratt et al., 2001).

Die Etablierung konstitutiver *Srf*-Mausmutanten offenbarte zudem, dass SRF ein unabdingbarer Faktor für die embryonale Entwicklung ist. So äußerte sich eine

konstitutive Deletion des Genes in sehr frühen embryonalen Entwicklungsstadien in Mausmutanten mit einer kleineren Körpergröße als wildtypische Geschwister sowie einer erhöhten Apoptoserate, bedingt durch die verminderte Expression antiapoptotischer Gene, wie *Bcl-2* und *Bcl-x* (Schratt et al., 2004). In der weiteren Entwicklung kommt es zu einem folgenschweren Defekt in der Mesodermbildung. Diese unterbleibt in SRF-defizienten Mäuseembryonen, was zum Tod der Embryonen in der frühen Gastrulationsphase (zwischen dem embryonalen Tag 8.5 (E8.5) und E12.5) führt (Arsenian et al., 1998). Durch die Herstellung verschiedener gewebe- und zellspezifischer konditionaler Mausmutanten konnten jedoch weitere Funktionen von SRF entschlüsselt werden.

So spielt der *Serum Response Factor* in der Entwicklung des kardiovaskulären Systems eine essentielle Rolle (Miano et al., 2004; Niu et al., 2005; Parlakian et al., 2004). Eine konditionale Herzmuskel-spezifische Deletion von SRF führte zu einem frühen Tod der Embryonen (zwischen E10 und E13.5), bedingt durch eine schwerwiegende Herzinsuffizienz als Folge der gestörten Kardiogenese. Des Weiteren war in diesen Mausmutanten die Genexpression Kardiogenese-regulierender Gene, wie z.B. *Nkx2.5*, *GATA4*, *Myocardin* und *c-fos* stark herunter reguliert (Niu et al., 2005; Parlakian et al., 2004).

SRF übernimmt zudem Funktionen im Gastrointestinaltrakt. Hierbei führte eine Depletion von *Srf* in glatten Muskelzellen adulter Tiere etwa drei Wochen nach Induktion der Rekombination zum Tod der Tiere aufgrund schwerwiegender Störungen der Darmperistaltik (Angstenberger et al., 2007; Mericskay et al., 2007). Kürzlich wurde SRF in Zusammenhang mit Magen- und Ösophagusulcera beschrieben. So wurde gezeigt, dass eine lokale Gentherapie mit VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und SRF cDNA eine drastische Beschleunigung der Ulceraheilung bewirkt (Tarnawski, 2005).

Des Weiteren übernimmt SRF eine wichtige Rolle in der Blutgefäßbildung. So konnte gezeigt werden, dass eine endothelzellspezifische Deletion von *Srf* in der Ausbildung von Aneurysmen (Gefäßerweiterungen) und Hämorrhagien (Blutungen) sowie einer reduzierten Genexpression des Adhäsionsproteins E-Cadherin führt, was letztendlich in einer embryonalen Letalität (E14.5) resultiert (Franco et al., 2008; Holtz and Misra, 2008).

Die konditionale *Srf*-Deletion der Skelettmuskulatur führt zu einer schweren Muskelhypoplasie (unzureichende Zellbildung), was zum perinatalen Tod der Mausmutanten führt (Li et al., 2005). In adulten Tieren resultiert eine SRF-Defizienz der Skelettmuskulatur in einer schweren Muskelhypotrophie (vermindertes Zellwachstum), unzureichender Regeneration und einer 50%-igen Mortalitätsrate 6 Wochen nach der Geburt (Charvet et al., 2006; Lahoute et al., 2008).

Das Fehlen von SRF in der Leber hat eine verschlechterte Regenerationsfähigkeit und eine verminderte Genexpression der IEGs nach partieller Leberentnahme zur Folge (Latasa et al., 2007). Wird *Srf* spezifisch in Leberzellen deletiert, so führt das in Mausmutanten zu einer reduzierten Körpergröße, reduzierten Genexpression von IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*) und gestörter Leberzellproliferation (Sun et al., 2009).

Neueste Daten beschreiben einen Zusammenhang zwischen SRF und der korrekten Entwicklung und Funktion der Retina in Mäusen (Sandstrom et al., 2011). Hierbei führte bei jungen Tieren, welche ein Transgen zur konstitutiven Überexpression von SRF besitzen (SRF-VP16), zu einer fehlerhaften Laminierung der Photorezeptorschicht sowie zu einer funktionellen Beeinträchtigung der Retina. In adulten Entwicklungsstadien wiesen transgene Mäuse, verglichen mit Kontrolltieren, eine degenerierte Retina auf.

Auch in der Haut übernimmt der Transkriptionsfaktor wichtige Funktionen (Koegel et al., 2009; Verdoni et al., 2010). So führt u.a. eine postnatale Deletion von *Srf* in Keratinozyten bei Mäusen zu einer Psoriasis-ähnlichen Hautläsion. Gekennzeichnet war dies durch Entzündungsprozesse, ein vermehrtes Wachstum und Proliferation der Epidermis sowie eine Störung des Aktinzytoskeletts (Koegel et al., 2009).

Die Rolle von SRF im Immunsystem ist bis dato ungenügend untersucht. Dennoch weisen erste Daten auf eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors in der korrekten Entwicklung von T-Lymphozyten hin (Fleige et al., 2007).

Eine Vielzahl von Funktionen übernimmt der *Serum Response Factor* im Zentralen Nervensystem. Da dies ein wichtiger Bestandteil der vorliegenden Arbeit darstellt, soll im nächsten Abschnitt (1.2.4.2) ausführlich auf die neuronalen Funktionen von SRF eingegangen werden.

1.2.4.2 Neuronale Funktionen von SRF

Als ubiquitärer Transkriptionsfaktor ist SRF auch im Zentralen Nervensystem (ZNS) stark exprimiert. Bei den Nagetieren gehören u.a. das Striatum, Cortex, Hippocampus und der olfaktorische Bulbus dazu (www.brain-map.org) (Alberti et al., 2005; Knoll et al., 2006; Stringer et al., 2002). Diese breitgefächerte Expression führt dazu, dass der *Serum Response Factor* eine Vielzahl verschiedener Funktionen im Nagetierhirn übernimmt. Gewebespezifische *Srf*-Mausmutanten bieten hierbei eine ideale Möglichkeit, die Rolle von SRF im ZNS zu untersuchen. Eine konstitutive, homozygote Deletion von *Srf* hat, wie in 1.2.4.1. erläutert, eine schwere Störung in der Mesodermbildung zur Folge, was zum Tod der Embryonen in der frühen Gastrulationsphase führt (Arsenian et al., 1998). Um dies zu umgehen und damit neuronale Funktionen des Transkriptionsfaktors auch in späteren Entwicklungszeitpunkten analysieren zu können, wurden vorderhirnspezifische konditionale *Srf*-Mausmutanten generiert (Alberti et al., 2005; Etkin et al., 2006; Ramanan et al., 2005). Im Labor von Prof. A. Nordheim, Universität Tübingen, wurde hierfür zuerst ein „gefloxtes“ *Srf* Allel (*Srf*^{flex1} für *floxed exon1*) konstruiert, wobei der Translationsstart des Exon1 und das Intron 1 von loxP-Elementen (*locus of crossing over*) flankiert wird (Wiebel et al., 2002). Bei loxP-Elementen handelt es sich um Erkennungssequenzen der Cre-Rekombinase (CRE = *causes/cyclization recombination*), ein Rekombinaseenzym des Bakteriophagen P1. Nach erfolgreicher Rekombination wird hierbei ein funktionsunfähiges SRF-Protein erzeugt. Anschließend wurden diese Mäuse mit *CamKII α -iCre* positiven Tieren gekreuzt (siehe **Abb. 1.11**) (Casanova et al., 2001). Die *CamKII α* ist eine spezifisch im ZNS vorkommende Proteinkinase, mit starker Expression im Hippocampus und Kortex sowie schwächerer Expression im Striatum, Thalamus und Hypothalamus (i.e. Vorderhirn). Im Cerebellum ist dieses Protein nicht vorhanden. Dadurch, dass sich das *Cre*-Gen hinter dem *CamKII α* -Promotor befindet, konnte es zu einer neuronenspezifischen und vorderhirnspezifischen Deletion von *Srf* kommen (Casanova et al., 2001; Knoll et al., 2006). Die *CamK* ist erst in späten embryonalen Entwicklungsstadien aktiv, was damit eine Untersuchung postnataler und adulter Mäuse ermöglicht. Das bedingt jedoch auch, dass in frühen postnatalen Stadien noch mehr funktionsfähiges SRF vorhanden ist als in späteren Stadien. Adulte Tieren können nicht untersucht

werden, da der besondere Phänotyp der Mutanten dazu führt, dass die Mäuse etwa 3 Wochen nach der Geburt sterben. Für die betreffenden Experimente dieser vorliegenden Arbeit wurden diese konditionalen *Srf*-Mutanten verwendet.

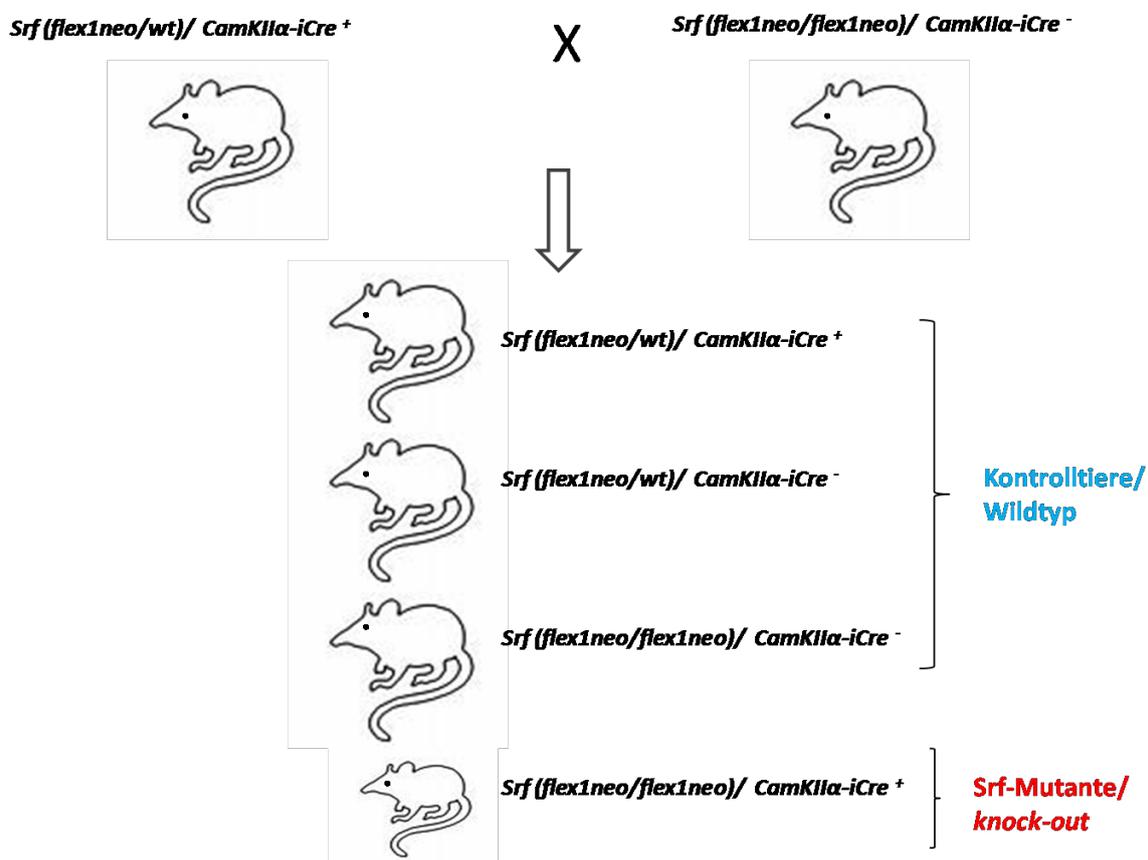


Abb. 1.11. Kreuzungsschema zur Generierung konditionaler *Srf*-Mutanten

Nähere Erläuterungen siehe Text

Als Regulator der Aktin-Dynamik (Schratt et al., 2002; Stern et al., 2009) ist es nicht verwunderlich, dass SRF eine wichtige Funktion in der neuronalen Zellmigration (Alberti et al., 2005), axonalen Lenkung und Wachstumskegelmotilität übernimmt (Knoll et al., 2006) (siehe **Abb. 1.12**). Die Notwendigkeit von SRF in der Zellmigration konnte zuerst anhand des *rostral migratory stream* (RMS) gezeigt werden, wo *Srf*-Mutanten schwere Migrationsdefekte neuronaler Vorläuferzellen aufwiesen (Alberti et al., 2005). Hierbei wanderten die Vorläuferzellen nicht wie üblich von der Subventrikularzone (SVZ) in den olfaktorischen Bulbus, sondern verweilten in der SVZ. Als mögliche Ursache für diesen Defekt wurde u.a. eine Veränderung in der

Genexpression zytoskelettaler Gene, wie β -Aktin und Gelsolin in Betracht gezogen. Diese waren in SRF-defizienten Mäusen herunterreguliert. Eine verstärkte Phosphorylierung, und damit Inhibierung, von Cofilin wurde ebenso als möglicher Grund für die Migrationsdefekte genannt (Alberti et al., 2005).

Neben dem Migrationsdefekt im RMS wurde für konditionale *Srf*-Mutanten auch ein axonaler Lenkungsdefekt bei der hippocampalen Moosfaserwegfindung nachgewiesen (Knoll et al., 2006). Wie unter 1.1.4.2 ausführlich beschrieben, senden in wildtypischen Mäusen die Körnerzellen des Gyrus dentatus ein suprapyramidales und infrapyramidales Moosfaserbündel aus, dessen Axone dann synaptische Kontakte mit den Dendriten der Pyramidenzellen der CA3-Region ausbilden. Diese Auftrennung der Moosfasern in zwei Äste unterbleibt völlig in *Srf*-Mutanten. Stattdessen wurde ein fehlgeleitetes Wachstum der Fasern in die CA3-Zellkörperregion des Hippocampus beobachtet, wo sie nun nicht wie normal mit den Dendriten der Pyramidenzellen, sondern mit den Zellkörpern Synapsen ausbildeten. Hierbei ist wichtig zu erwähnen, dass Mausmutanten, bei denen das Zelladhäsionsmolekül NCAM (*neuronal cell adhesion molecule*) (Seki and Rutishauser, 1998) und das Lenkungsmolekül Semaphorin (Suto et al., 2007) betroffen sind, einen ähnlichen Phänotyp bezüglich der Moosfaserwegfindung wie *Srf*-Mutanten zeigen. Des Weiteren konnte eine Beeinträchtigung der Wachstumskegelmotilität in SRF-defizienten Mäusen beobachtet werden. Im sogenannten Wachstumskegel-Kollaps-Assay konnte gezeigt werden, dass SRF ein wichtiger Faktor des Ephrin-A und Semaphorin vermittelten Wachstumskegelkollaps ist. Kontrollneurone zeigten nach Stimulation mit diesen repulsiv wirkenden Lenkungsmolekülen einen vollständigen Wachstumskegelkollaps, was auf einer völligen Depolymerisation des Aktinzytoskeletts beruht. Hingegen resultierte eine Stimulation mit Ephrin-A5 in SRF-defizienten Neuronen in einer Bildung von teppichschlägerartigen F-Aktin-Mikrotubulstrukturen. Diese Beobachtung weist auf eine gestörte Depolymerisation des Zytoskeletts hin. In weiteren *in-vitro* Experimenten konnte zudem ein vermindertes Neuritenwachstum SRF-defizienter Neurone nachgewiesen werden (Knoll et al., 2006).

Jedoch führt das Fehlen von SRF nicht nur im ZNS zu aberranten axonalen Lenkungsprozessen und fehlerhaftem Neuritenwachstum. Auch im peripheren Nervensystem (PNS) konnte die Beteiligung von SRF an diesem Prozess

nachgewiesen werden. So führt eine spezifische Deletion von *Srf* in embryonalen sensorischen Spinalganglien (DRG = *dorsal root ganglion*) zu einem gestörten axonalen Wachstum, Verzweigungen und Innervation des Zielgebietes (Wickramasinghe et al., 2008).

Neuste Daten weisen zudem darauf hin, dass SRF auch eine wichtige Rolle in der Organisation hippocampaler Schichten (Laminierung) und Nervenfasern übernimmt (Stritt and Knoll), da diese Prozesse in SRF-defizienten Mäusen schwere Störungen aufzeigen. Als mögliche Ursache hierfür wird eine Interaktion mit Reelin, einem wichtigen Molekül in der hippocampale Laminierung, genannt.

Erst kürzlich konnte zudem gezeigt werden, dass SRF in der Differenzierung von Oligodendrozyten (OD) und der Myelinisierung involviert ist (Stritt et al., 2009). SRF-defiziente Mäuse wiesen eine erhöhte Menge an OD-Vorläuferzellen und eine erniedrigte Menge an ausdifferenzierten OD auf, was eine gestörte Myelinisierung und ein mögliches Absterben von Axonen zur Folge hatte. Da die Myelinisierung von Axonen hauptsächlich durch Gliazellen erfolgt, in diesen jedoch *Srf* nicht deletiert wird, wurde angenommen, dass in Neuronen exprimiertes SRF benachbarte Gliazellen über einen parakrinen Mechanismus (durch Sekretion von Signalmediatoren, welche die Oligodendrozytendifferenzierung steuern) beeinflussen.

Durch die Generierung konditionaler *Srf*-Mausmutanten, in denen SRF erst in der adulten Lebensphase ausgeschaltet wird, konnte dem *Serum Response Factor* eine unabdingbare Rolle in der Induktion aktivitätsabhängiger Genexpression, synaptischer Plastizität sowie Lern- und Gedächtnisleistungen zugeschrieben werden (Etkin et al., 2006; Platenik et al., 2000; Ramanan et al., 2005). Für die Ausbildung von Synapsen stellt die Regulation der Genexpression durch den Neurotransmitter Glutamat ein wichtiger Mechanismus dar. Dieser stimuliert die rasche Induktion der IEGs, wie *c-fos*, *Egr1*, *Egr2* und *Arc*. Hierbei konnte in *Srf*-Mutanten gezeigt werden, dass das Fehlen von SRF zu einer geminderten aktivitätsabhängigen IEG Expression führt (Ramanan et al., 2005; Xia et al., 1996). Auch die Langzeitpotenzierung CA1-pyramidaler Zellen (LTP, *long term potentiation*) wies in diesen Mausmutanten erhebliche Defekte auf, was zu einer Veränderung der Lern- und Gedächtnisleistung führte.

Es wurde weiterhin ein Zusammenhang zwischen SRF und neurodegenerativen Krankheiten, wie Epilepsie oder Morbus Alzheimer, gezeigt (Morris et al., 1999; Tong et al., 2004). Hauptkennzeichen des Morbus Alzheimer, einer Krankheit die weltweit 30 Millionen Menschen betrifft, stellen zum einen ein reduzierter Blutfluss durch das Hirnparenchym und zum anderen eine Ablagerung und Anhäufung von amyloiden Plaques in Gehirn und Blutgefäßen dar. Das resultiert letztendlich in einem Verlust der Neuronen und äußert sich beim Menschen u.a. in einer Wesensänderung und starkem Gedächtnisverlust. Bei betroffenen Patienten wurde hier eine erhöhte SRF-Menge in den glatten Muskelzellen der Blutgefäße festgestellt, was zu dem beschriebenen verminderten Blutfluss führt. Eine therapeutische Inhibierung von SRF mit shRNA (*short hairpin RNA*) führte in Nagetieren zu einer verbesserten Hirndurchblutung und Normalisierung der kontraktiven Aktivität der Blutgefäße (Miano, 2010).

Es kann zusammenfassend gesagt werden, dass SRF im Gehirn neben einer Vielzahl von Funktionen im postnatalen und adulten Gehirn auch entscheidend für neuropathologische Prozesse ist.

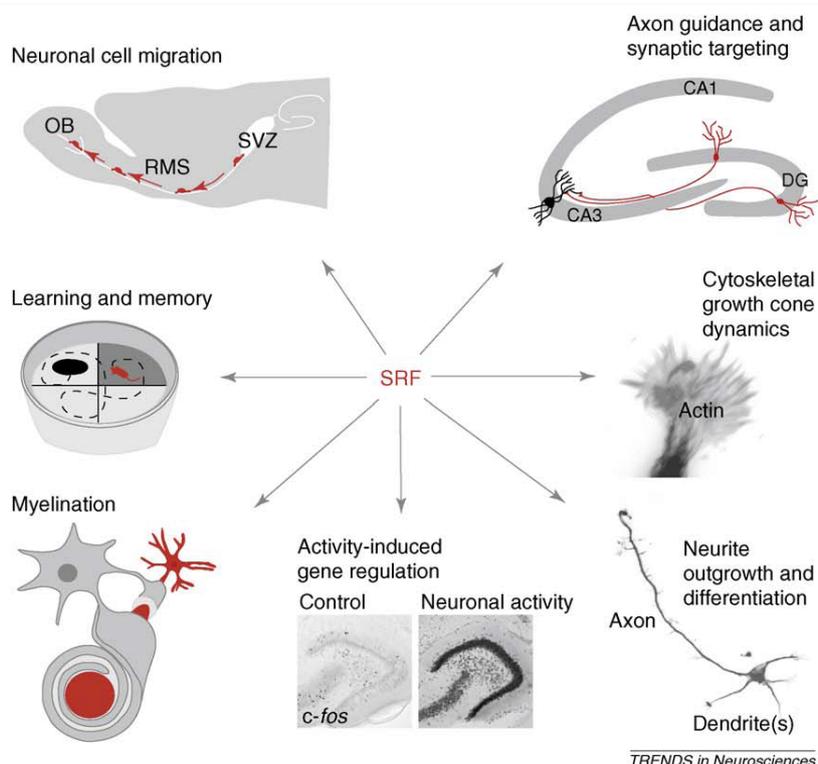


Abb. 1.12. Überblick neuronaler Funktionen von SRF.

Näheres siehe Text. (Knoll and Nordheim, 2009)

1.3 Zielstellung dieser Arbeit

Für eine korrekte Etablierung neuronaler Netzwerke spielen axonale Lenkungsmoleküle eine unabdingbare Rolle. Das abgestimmte Zusammenspiel repulsiver und attraktiver Moleküle ermöglicht dem Wachstumskegel sein finales Zielgebiet zu erreichen, wo dann Synapsen ausgebildet werden können. Es wurde gezeigt, dass das Lenkungsmolekül *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) als attraktiver Faktor wirkt, was *in-vivo* z.B. in der Ausbildung axonaler Verzweigungen und dem Auswachsen von Neuriten resultiert (Fitzgerald et al., 2008). Im Gegensatz dazu vermittelt die vorwärts gerichtete EphA-Signaltransduktion einen repulsiven Effekt, welcher sich in einem Wachstumskegelkollaps äußert (Knoll et al., 2006; Stern et al., 2009). Wie der Wachstumskegel diese gegensätzlichen Signalinstruktionen integriert, ist bislang unzureichend aufgeklärt. Ziel dieser Arbeit war daher, stattfindende Interaktionen zwischen BDNF und Ephrin-A und deren zugrunde liegenden molekularen Mechanismen zu untersuchen.

Hierfür wurden u.a. neben immunzytochemischen Experimenten auch Analysen auf Proteinebene sowie Luziferase Reporterstudien durchgeführt. Ein besonderer Fokus lag auf der Untersuchung der Wachstumskegelmotilität und der Untersuchung von Genexpressionsprogrammen, welche durch die BDNF-Ephrin-A Interaktion ausgelöst werden. Dieser Prozess sollte dabei in Abhängigkeit des *Serum Response Factors* (SRF) untersucht werden. SRF – ein Transkriptionsfaktor der MADS-Box Familie – übernimmt wichtige Funktionen in der Regulation der (Aktin)-Zytoskelettdynamik, synaptischen Plastizität, neuronalen Migration, axonalen Wegfindung und in der Antwort früh-vermittelter Gene (Alberti et al., 2005; Knoll and Nordheim, 2009; Ramanan et al., 2005). Eine konditionale Deletion von *Srf* in sehr späten embryonalen Entwicklungsstadien der Maus führt u.a. zu einem schweren Defekt der hippocampalen Moosfaserwegfindung. So war ein weiteres Ziel dieser Arbeit herauszufinden, welche Mechanismen diesem Defekt zugrunde liegen und neue Faktoren zu ermitteln, welche in den Prozess der Moosfaserfehlleitung involviert sind. Zur Untersuchung dieses Sachverhalts wurden neben molekularbiologischen Untersuchungen auch die *in-vivo* nahe Methode der organotypischen Kultur verwendet.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Elektroporator	Dr. L. Fischer, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Zeiss
LSM konfokales Mikroskop	Zeiss
Gewebeschneider	Mclwan
Luminometer Lumat LB 9507	EG&G Berthold
Mini Trans-Blot Cell® mit Bio-Eis Kühleinheit	Bio-Rad
Vibratom	Leica
Kryostat	Leica
Western Blot-Entwicklermaschine M-35-X-Omat	Kodak

2.1.2 Chemikalien

β-Mercapthoethanol (β-ME)	AppliChem
Adenosintriphosphat (ATP)	AppliChem
Agar	AppliChem
Agarose	Genaxxon
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth
Ampicillin	AppliChem
Borax	Sigma
Borsäure	Applichem
Bromphenolblau	AppliChem
Bovines Serum Albumin Fraktion V (BSA)	AppliChem
Chloroform	Sigma
DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol)	AppliChem
Dil (1,1',di-octadecyl-3,3,3'- tetramethylindocarbocyanine perchlorate)	Molecular Probes

Dimethylsulfooxid (DMSO)	AppliChem
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem
Entellan	Merck
Essigsäure	AppliChem
Essigsäureanhydrid	Sigma
Ethanol (EtOH)	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem
Ethidiumbromid	Roth
Firefly Luziferase (freie Säure)	AppliChem
Formaldehyd (37%)	Roth
Formamid	AppliChem
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories
Galacton	Tropix
Gentamicin	Invitrogen
Glucose	Sigma
Glycerin	AppliChem
Glycin	AppliChem
Glycylglycin	AppliChem
Hefeextrakt	AppliChem
HEPES(2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	AppliChem
Isopropanol	Fluka
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	AppliChem
Laminin	Sigma
Levamisol	Sigma
L-Glutamin	Invitrogen
Lithiumchlorid	AppliChem
Magermilchpulver	AppliChem
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	AppliChem
Methanol (MetOH)	Sigma

Moviol	Calbiochem
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)	Roth
Natriumcitrat	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem
Natriumfluorid (NaF)	Applichem
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Sigma
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Natriumdihydrogenphosphat (Na ₂ H ₂ PO ₄)	Merck
Natriumdihydrogenphosphathydrat (Na ₂ H ₂ PO ₄ *H ₂ O)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma
Natrium-Pyruvat	Invitrogen
Normales Ziegen Serum (NGS)	Biowest
Paraformaldehyd (PFA)	AppliChem
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen
Pepton	AppliChem
Pferdeserum (" <i>horse serum</i> ", HS)	Invitrogen
Phalloidin Texas Red-X	Invitrogen
Phenol-Chloroform	AppliChem
Phenylmethylsulfonylfluorid	AppliChem
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	AppliChem
Polyethylenglycol 8000 (PEG)	AppliChem
Poly-L-Lysin (PLL)	Sigma
Ponceau-S	Sigma
Propylgallat	AppliChem
Salzsäure (HCl)	Roth
Sucrose	AppliChem
Triethanolamin	Sigma
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma
Tris-Phosphat (Tris-PO ₄)	AppliChem
Trichloressigsäure	AppliChem
Triton®-X-100	AppliChem

Trypton	AppliChem
Tween 20	AppliChem
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	AppliChem

2.1.3 Materialien und Reagenzien

2.1.3.1 Materialien und Reagenzien für zellbiologische Arbeiten

2.1.3.1.1 *Materialien und Reagenzien für die neuronale Zellkultur*

Boratpuffer	0,05 M Borsäure 12,5 mM Borax pH 8,5 einstellen filtrieren, bei 4°C aufbewahren
DMEM <i>(Dulbecco's Modified Eagle Medium)</i>	Invitrogen, #31966-047 + 10% Pferdeserum
Elektroporationslösung	Mirus
Elektroporationsküvetten	Amaxa
Elektroporationspipetten 1 ml	Mirus
Glaspasteurpipetten	Hirschmann
HBSS <i>(Hanks' Balanced Salt Solution)</i>	Invitrogen, #14170-138
humanes Ephrin-A5/Fc-Chimere	R&D Systems
humanes rekombinantes BDNF	Pepto Tech

PhosStop (Phosphataseinhibitormix)	Roche
Natriumorthovanadat (NV)	Sigma
Okadainsäure (OS)	Calbiochem
NMEM (<i>Neuronal Minimal Essential Medium</i>)	1 x MEM (Invitrogen, #21430-079) 2% B27 Supplement (Invitrogen) 0,6% Glucose 2 mM L-Glutamin 0,22% NaHCO ₃ 1 mM Natrium-Pyruvat steril filtrieren, bei 4 °C aufbewahren Zugabe von 5 µg/µl Gentamicin
4-Loch-Zellkulturschale	Nunc
Sterilfilter (0,45 µm)	Millipore
Sterilspritze	Henke Sass Wolf
Sterilwaren für die Zellkultur	Becton Dickinson
1 x Trypsin/EDTA	Invitrogen

2.1.3.1.2 Materialien und Reagenzien für die Zellkultur von HEK293-Zellen

Waschlösung	1x PBS
-------------	--------

Trypsin/EDTA (1x)	Invitrogen
Zellkulturmedium	DMEM + Glutamax (#31966-047) + 10% FCS (hitzeinaktiviert, steril filtriert) + 1% Penicillin G/ Streptomycin)
75 cm ² Zellkulturschalen	BD Falcon
Einfriermedium	Zellkulturmedium + 20% DMSO (steril filtriert)
Kryostatröhrchen	Simport
Opti-MEM (<i>Reduced Serum Medium</i>)	Invitrogen
Falconröhrchen	BD Falcon

2.1.3.1.3 Materialien und Reagenzien für immunzytochemische Färbungen

Deckgläschen	Menzel (Φ12mm)
Fixierlösung	4% PFA 5% Sucrose in PBS
Permeabilisierungslösung	0,1 % bzw. 0,2 % Triton-X-100 in PBS
Blockierungslösung	2 % BSA/ PBS bzw. 5 % FCS/ 0,05 % Tween/ PBS

DAPI	2 µg/ ml in PBS
Moviol-Lösung	5 g Moviol/ 20 ml PBS, ü.N (über Nacht), rühren, 10 ml Glycerin zugeben, ü.N. rühren, zentrifugieren (15 min, 4000 rpm), Überstand abnehmen, Spatelspitze Propylgallat zugeben, zentrifugieren (15 min, 4000 rpm), adäquate Aliquots vorbereiten, bei -20°C lagern

Sterilwaren Becton Dickinson

4-well-Platten Nunc

2.1.3.1.4 *Materialien, Puffer und Lösungen für die Immunhistochemie*

PBST PBS mit 0,1 % Tween-20

Blockierungslösung PBST mit 5 % (v/v) NGS

„Quenching“ Lösung
49,5 % (v/v) PBS
49,5 % (v/v) Methanol
1 % H₂O₂

Vectastain ABC Kit Lösung
Vector (#PK-6100)
ABC Reagenz A 1:100 +
ABC Reagenz B 1:100
in PBST

Peroxidasesubstratlösung
10 % 1M Tris 10x pH 7,6
0,1 % H₂O₂
89,4 % H₂O
0,5 % DAB (Sigma)

Objekträger Superfrost® 76 x 26 mm Thermo Scientific

Deckgläser 24 x 55 mm Marienfeld

Entellan Merck

2.1.3.1.5 *Firefly Luziferase Assay*

Zelllysispuffer
25 mM Tris-PO₄ pH 7,8
2 mM EDTA pH 8
10% (v/v) Glycin
1% Triton® X 100
2 mM DTT

Firefly Luziferase Messpuffer
(w/o ATP)
25 mM Glycylglycin
15 mM MgSO₄
10 mM Tris-Base
autoklaviert

Luziferin Stocklösung
25 mM Firefly Luciferin (freie Säure)
25 mM NaOH

β-Galactosidase Reaktionspuffer
100 mM NaHPO₄
1 mM MgCl₂
0,1% (v/v) Galacton

β-Galactosidase Stopplösung
2,5% (v/v) Emerald Enhancer

200 mM NaOH

2.1.3.1.6 Materialien, Puffer und Lösungen für die in-situ Hybridisierung

Alle Gebrauchsgegenstände (z.B. Flaschen, Messzylinder, Deckgläser, Pinzetten, Bechergläser) wurden zuvor für 3 h bei 180 °C gebacken. Das Wasser zur Herstellung der Puffer wurde mit 0,1 % v/ v DEPC versetzt, 2 h gerührt und anschließend autoklaviert.

Objektträger SuperFrost Plus	Menzel
Kryostateinwegklingen	Leica
Gewebeeinbettmedium	Jung
DEPC (Diethylpolycarboinat)	Sigma
RNase freie Deckgläser	Deckgläser 3 h bei 180 °C backen 5 s in Repelsilan, 2% Dimethyldichlorsilan in 1,1,1- Trichlorethan tauchen 5 s in Aceton 5 s in abs. EtOH
Restriktionsenzyme (BamHI, EcoRI)	New England Biolabs
10 x Dig-RNA Markierungsmix (Anti-Digoxigenin-AP)	Roche
RNA-Polymerase (T3/ T7)	

10 x Transkriptionspuffer	Promega
50 x Denhardts	Sigma
tRNA (E.coli)	Roche
Herings DNA	Promega
1 % TAE-Agarosegel	Ansatz : 1 µl Sonde 0,5 µl RNA-Ladepuffer 1,5 µl H ₂ O _{DT} 2 µl Formamid Ansatz 3 min bei 100 °C denaturieren, dann sofort auf Eis. Vor dem Auftragen der Proben, Kamm und Schlitten des Gelapparates mit 3 % H ₂ O ₂ reinigen. 1h, 60 V, 200 mA
Acetylierungslösung	6,19 g Triethanolamin 0,75 ml 10 N NaOH 295 ml H ₂ O 0,595 ml HCl (rauchend) kurz vorher: Essigsäureanhydrid kurz rühren
Blockierungslösung	B1-Puffer + 10 % FCS
PB-Puffer (0,2 M)	82,67 g Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O 12,79 g NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 2 l H ₂ O _{DT} autoklavieren
PBS	0,1 M PB

	0,15 M NaCl in H ₂ O _{DT} autoklavieren
20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M Natrium-Citrat pH 7,0 in H ₂ O _{DT}
Hybridisierungslösung	50 % Formamid 5 x SSC 5 x Denhardts 0,25 mg/ml tRNA (E.coli) 0,5 mg/ ml Herings DNA in H ₂ O _{DT}
B1-Puffer	0,1 M Tris pH 7,5 0,15 M NaCl in H ₂ O _{DT}
B2-Puffer	B1-Puffer + 1 % FCS
B3-Puffer	0,1 M Tris pH 9,5 0,1 M NaCl 50 mM MgCl ₂ in H ₂ O _{DT}
B4-Puffer	pro ml B3-Puffer: 4,5 µl NBT (Promega, 50 mg/ ml) 3,5 µl BCIP (Promega, 50 mg/ml) 0,24 mg Levamisol
TE-Puffer	10 mM Tris pH 8,0

1 mM EDTA pH 8,0
in H₂O_{DT}

2.1.3.1.7 Materialien, Lösungen zur Herstellung organotypischer Schnittkulturen

Millicell® Zellkultureinsatz (PICMO3050)	Millipore
HEPES-Lösung	1 M HEPES in HBSS, steril filtrieren, bei -20°C aufbewahren
Präparationsmedium	25 mM HEPES-Lösung in HBSS bei 4°C aufbewahren
Zellkulturmedium	1 x MEM 25 % HBSS 25 % HS 25 mM HEPES-Lösung 0,6 % Glucose 2 mM L-Glutamin steril filtrieren, bei 4°C aufbewahren
Einmalskalpell	Braun
Einwegrasierklinge	Wilkinson

2.1.3.1.8 Materialien und Lösungen zum Anfärben der Schnittkulturen

Dil-Lösung 10 mg/ ml in DMSO

Glaskapillaren (GB150TF-10) Science Products

2.1.3.1.9 Puffer und Lösungen für die Alkalische-Phosphatase (AP)- Färbung auf Kryostatschnitten

HBHA 0,5 mg/ ml BSA
0,1 % NaN₃
20 mM HEPES pH 7,0
in HBSS

HBS 20 mM HEPES pH 7,0
150 mM NaCl
in ddH₂O

AP-Puffer 0,1 M Tris/ HCl pH 9,5
0,1 M NaCl
5 mM MgCl₂
in ddH₂O

BCIP/ NBT Promega

AP-Substratlösung AP-Puffer
3,5 µl BCIP /ml AP-Puffer
4,5 µl NBT/ ml AP-Puffer
kurz vor Gebrauch ansetzen, im
Dunkeln lagern

2.1.3.2 Materialien und Reagenzien für proteinbiochemische Arbeiten

2.1.3.2.1 Materialien und Reagenzien zur Herstellung von Proteinlysaten

Lysispuffer	50 mM Tris pH 7,4 150 mM NaCl 1% Triton X-100 1 mM EDTA 1 mM PMSF 1 mM Na ₃ VO ₄ 1 mM NaF 1 mM Na ₄ P ₂ O ₇ 1x Proteaseinhibitor-Mix (Roche) in Aqua bidest.
Zellschaber	TPP

2.1.3.2.2 Materialien und Reagenzien für die Proteinbestimmung nach Bradford

Bradford-Reagenz	BioRad
------------------	--------

2.1.3.2.3 Materialien und Reagenzien für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

4 x Trenngelpuffer	1,5 M Tris/ HCl pH 8,8 0,4% SDS
2 x Sammelgelpuffer	0,25 M Tris/ HCl pH 6,8 0,2 % SDS

10 % Trenngel	1x Trenngelpuffer 10 % PAA 0,1 % SDS 0,075 % TEMED 0,05 % APS
4 % Sammelgel	1x Sammelgelpuffer 4 % PAA 0,1 % SDS 0,1 % TEMED 0,05 % APS
SDS-Gelelektrophoresepuffer	25 mM Tris/HCl pH 8,3 192 mM Glycin 0,1 % SDS
6x Proteinladepuffer	300 mM Tris pH 6,8 600 mM β -ME (14,3 M) 6 % SDS 60 % Glycerol 0,1 % Bromphenolblau
Protein-Größenmarker (11- 170 kDa)	Fermentas

2.1.3.2.4 Materialien und Reagenzien für den Western Blot

PVDF Immobilon-P Transfermembran	Millipore
Whatmanpapier	Whatman

Transferpuffer	25 mM Tris/HCl pH 8,3 192 mM Glycin 20% (v/v) Methanol
1x TBST	50 mM Tris-HCl pH 8 150 mM NaCl 0,1% (v/v) Tween-20
Ponceau S-Färbelösung	0,02% Ponceau S 0,3% Trichloressigsäure in 1x TBST
Blockierungslösung	5% Magermilchpulver (w/v) in 1 xTBST
Chemilumineszenzsubstrat (ECL)	Pierce
Röntgenfilme	Ceaverken AB

2.1.3.3 Materialien, Puffer und Reagenzien für molekularbiologische Arbeiten

2.1.3.3.1 Materialien für die Genotypisierungen

10 x Red Taq PCR Puffer	Thermo Scientific
dNTP-Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Genaxxon, 10 mM finale Konzentration in Aqua bidest. pH 7,0
Schwanzlysepuffer	100 mM Tris pH 8,3 5 mM EDTA

0,2% SDS
 200 mM NaCl
 0,2 µg/ml Proteinase K

2.1.3.3.2 Materialien und Reagenzien für die Agarose-Gelelektrophorese

Agarosegel 1-2% (w/v)	Agarose in 1x TAE in der Mikrowelle erhitzen und auf 50 °C abkühlen lassen, Zugabe von 1 µl Ethidiumbromid/ 100ml Agarosegel Lösung
Ethidiumbromid-Stammlösung	1% (w/v), 10mg/ml
DNA-Größenmarker (100bp, 1,5 kb)	Genaxxon
50 x TAE	2 M Tris-Base 1 M Eisessig 0,05 M EDTA pH 8,0

2.1.3.3.3 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

LB-Medium	0,5 % Hefeextrakt 1 % NaCl 1 % Trypton in Aqua bidest. pH 7,2 – 7,5 autoklavieren, bei 4 °C aufbewahren
-----------	--

2x LB-Medium	1 % Hefeextrakt 2 % NaCl 2 % Trypton in Aqua bidest. pH 6,1 steril filtrieren, bei 4°C aufbewahren
PEG-3350-Lösung	50 % PEG 3350 (w/v) in Aqua bidest.
Kompetenzpuffer	50 % 2 x LB (v/v) 10 % PEG 3350 5 % DMSO 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 10% Glycerol
<i>E.coli</i> (DH5α Stamm)	Prof. Dr. A. Nordheim, Uni Tübingen

2.1.3.3.4 Transformation chemisch kompetenter Zellen

KCM-Lösung	100 mM KCl 30 mM CaCl ₂ 50 mM MgCl ₂
LB-Agarplatten	LB-Medium mit 1,5 % Agar versetzen, autoklavieren, entsprechendes Antibiotikum hinzufügen (100 µg/ ml Ampicillin; 30 µg/ ml Kanamycin), in Petrischalen ausgießen, erkalten lassen, bei 4°C dunkel lagern

2.1.3.3.5 *Materialien und Reagenzien für Plasmidisolierung*

15-, 50-ml Falcon

Becton Dickinson

70 % Ethanol

100 % Isopropanol

Puffer P1

QIAfilter® Plasmid Midi Kit von QIAGEN

Puffer P2

Puffer P3

Puffer QBT

Puffer QC

Puffer QF

2.1.3.3.6 *Materialien und Reagenzien für RNA-Isolierung*

70% Ethanol

RLT Puffer (Zugabe von 10µl β-ME/ 1ml)

RNeasy® Mini Kit, QIAGEN

RW1 Puffer

RLT Puffer

RNase freies H₂O

Einmalspritzen 1ml

Henke Sass Wolf

Einmalkanülen 20Gx1 1/2

Henke Sass Wolf

Zellschaber

TPP

2.1.3.3.7 Materialien und Reagenzien für den DNaseI-Verdau

10 x DNaseI Puffer	0,4 M Tris/HCl pH 7,5
DNaseI, RNase frei	Roche

2.1.3.3.8 Materialien und Reagenzien für die cDNA-Synthese

dNTP-Set	Genaxxon
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega (200 U/μl)
5x MLV-RT Puffer	Promega
<i>Random Hexamers (dN₆)</i>	Sigma, 100 μM Stammlösung
RNase Inhibitor	Fermentas (40 U/μl)

2.1.3.3.9 Materialien für die RT-PCR

Primer	Sigma (100 μM Stammlsg.)
96-Loch-Mikrotiterplatten	Abgene
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems
Versiegelungsfolien	Abgene

2.1.4 Oligonukleotide

2.1.4.1 Oligonukleotide für die RT-PCR

Alle Primer wurden mit Hilfe des Softwareprogrammes Primer Express 1.0 entworfen.

Primername	Primersequenz in 5' --> 3' Richtung
<i>Actn1 fw</i>	ACC CTC CCG GAT GCA GA
<i>Actn1 rev</i>	CTG GAC GAT CTT GGA CAC TTCA
<i>Arc fw</i>	GCA CAA AAG CCA TGA CCC AT
<i>Arc rev</i>	TCT CCC TAG TCC CCA GGG C
<i>β-Actin fw</i>	GGC GCT TTT GAC TCA GGA TT
<i>β-Actin rev</i>	GGG ATG TTT GCT CCA ACC AA
<i>Ccl12 fw</i>	AAT CAC AAG CAG CCA GTG TCC
<i>Ccl12 rev</i>	GTC AGC ACA GAT CTC CTT ATC CAG T
<i>C4 fw</i>	CTG AAG ATT CTG AGT TTG GCC C
<i>C4 rev</i>	CAG CTA GCC GTC TCC TGC A
<i>c-fos fw</i>	CCT GCC CCT TCT CAA CGA C
<i>c-fos ver</i>	GCT CCA CGT TGC TGA TGC T
<i>Cofilin fw</i>	TCT GGG CCC CCG AGA AT
<i>Cofilin rev</i>	TTG ATG GCA TCC TTG GAG C
<i>Dnal1 fw</i>	GCT CAA ATA TGA CAC CCC GGT
<i>Dnal1 rev</i>	TTC AGT GGC CGA GCC G
<i>Dusp5 fw</i>	TAC CAT GCA TCC AAG TGC GA
<i>Dusp5 rev</i>	TCA CAG TGA ACC AGG ACC TT
<i>Egr1 fw</i>	GCC GAG CGA ACA ACC CTA T
<i>Egr1 rev</i>	TCC ACC ATC GCC TTC TCA TT
<i>Egr2 fw</i>	GTT GAC TGT CAC TCC AAG AAA TGG
<i>Egr2 rev</i>	AGC GCA GCC CTG TAG GC
<i>Enah fw</i>	GGA GCT TAT TGA CGC AAT CAG G
<i>Enah rev</i>	CCC CTC CGT AGT TTG CTT CTT
<i>Epha4 fw</i>	AAC GGC TCC TTG GAT GCT T
<i>Epha4 rev</i>	ATG CCC ACC AGC TGA ATG AC
<i>Epha7 fw</i>	CAG AGG CTC TTC GCT GCT GT
<i>Epha7 rev</i>	ACT CCA CTC ACT TGC GAG GG
<i>Ephb1 fw</i>	CCG GAA CCC AGC TAG TCT CA
<i>Ephb1 rev</i>	GGA TAG AGC GGT CAA GCA GG
<i>Flna fw</i>	CGC GCC TCA AAA TGA GTA GC
<i>Flna rev</i>	AAT CGA TAC TGC CTC CCG G
<i>Gapdh fw</i>	TGG ATC TGA CGT GCC GC
<i>Gapdh rev</i>	TGC CTG CTT CAC CAC CTT C
<i>Glycam1 fw</i>	ACT CAG CCC ACA GAT GCC
<i>Glycam1 rev</i>	ACT CTC CTC ACT GGT GTA GCT GG
<i>Plxna3 fw</i>	GGT CGC CTA CAA GCG TAA GAC T
<i>Plxna3 rev</i>	CAG GTT GTC CAT TTG TAG CTG AAG
<i>Selp fw</i>	AGA TTG CCA CCA CTG ACC CTA
<i>Selp rev</i>	GAG TCT GTG CTC AGC ATC CCA
<i>Srf fw</i>	TGT GCA GGC CAT TCA TGT G
<i>Srf rev</i>	ACA GAC GAC GTC ATG ATG GTG
<i>Tpm1 fw</i>	CTG ATA AGA AGG CGG CGG
<i>Tpm1 rev</i>	TCT TTT GCA GTG ACA CCA GCT C
<i>Tpm2 fw</i>	AAT GCC ATC GAC CGC G
<i>Tpm2 rev</i>	AGC TGC TTG CAT CGG TCT TC
<i>Vcl fw</i>	CCA AGG TCA GAG AAG CCT TCC
<i>Vcl rev</i>	CGT AGC TGT TCA AGG TCT GGT

2.1.4.2 Oligonukleotide für die Genotypisierung

Genotyp	Primernamen	Primersequenz in 5' --> 3' Richtung
CamKII α	CreS	ATG CGG TGG GCT CTA TGG CTT CTG
	CreAS	TGC ACA CCT CCC TCT GCA TGC ACG
	PCR3	AAG AAG GGT CCG GCC CCG AAG ATG CTG GGC
	PCR4	CTG GAT GCC CTC TCC TTC CCC GGA GCC CTG
EphA7	MDK1-wt	TTC TAA GGT CCT AAT TTG CCT GAG
	MDK1-wt/mt	GAG TCC AGG ATT CCC TCC CAG ATC
	MDK1-mt-neo	CGA AGT TAT TAG GTC CCT CGA AG
Srf	AW	AGT TCA TCG ACA ACA AGC TGC GG
	BW	GAG ATT TCC ACA GAA AGC AAC GG
	CW	TGA TAT TGC TGA AGA GCT TGG CGG C

2.1.4.3 Oligonukleotide für die in-situ Hybridisierung

In situ-Sonde	Primersequenz in 5' --> 3' Richtung
<i>Glycam1 isH fw</i>	AAT GGA TCC TAT TTG TCA GTC TTG CTG CCA C
<i>Glycam1 isH rev</i>	AAT GGA TTC TAC CCA GTT CTT CCT CCA CTG T
<i>Selp isH fw bm</i>	AAT GGA TCC ACG ATT TTG AGG ACC CTG ACT A
<i>Selp isH rev bm</i>	AAT GAA TTC AGT AGT TCC GCA CTG GGT ACA T
<i>Selp isH fw neu</i>	AAT GGA TCC GTG GCT CAC CCT GAG CTG
<i>Selp isH rev neu</i>	AAT GAA TTC CGT GGG TGC TGG TTT TGA GG
<i>C4 isH fw</i>	AAT GGA TCC CCC TCG ACT GCT AAG GTC AC
<i>C4 isH rev</i>	AAT GAA TTC AGT GAG GCC CTA ACC CTG AG
<i>Ccl12 isH fw</i>	AAT GGA TCC AGA TTT CCA CAC TTC TAT GC
<i>Ccl12 isH rev</i>	AAT GAA TTC TTA ACC CAC TTC TCC TTG GGG TC

2.1.5 Antikörper

2.1.5.1 Primärantikörper

Antigen	Herkunft	Bezugsquelle	Verdünnung	Methode
Calbindin	Maus, monoklonal	Swant	1: 500	Immunhistochemie (IHC)
Calretinin	Kaninchen, polyklonal	Swant	1: 5.000	ICH
β-Tubulin	Maus, monoklonal	Sigma	1: 5000 1:1000	Immuncytochemie (ICC) WB
EphA4	Maus, monoklonal	BD Transduction Systems	1: 750	WB
EphA7	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz	1: 200 1: 20	WB ICH
GAPDH	Maus, monoklonal	Acris	1: 50.000	WB
humanes IgG (Fc-spezifisch)	Ziege, polyklonal	Sigma	10 µg/ ml	Oligomerisierung von Ephrin-A5
Phospho- p44/42	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling	1:1000 1: 300	WB ICC
p44/42	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling	1:1000 1: 300	WB ICC
Phospho- EphA3	Kaninchen, polyklonal	Greenberg Labor, Harvard Medical School, Boston	1:10.000	WB
Phospho-TrkB	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling	1:1000 1: 500	WB ICC
TrkB	Maus, monoklonal	Santa Cruz	1:1000	WB
Ras-GAP	Maus, monoklonal	Santa Cruz	1:100	ICC

2.1.5.2 Sekundärantikörper

Antigen	Konjugat	Herkunft	Bezugsquelle	Vedünnung	Verwendung
Kaninchen IgG	HRP	Esel	Amersham	1: 5000	WB
Maus IgG	HRP	Schaf	Amersham	1: 5000	WB
Anti-Fc	Cy3	Ziege	Sigma	1: 200	ICC
Digoxigenin	AP	Schaf	Roche	1: 7500	In-situ- Hybridisierung
Kaninchen IgG	Biotin	Ziege	Vector Laboratories	1: 500	ICH
Maus IgG	Biotin	Ziege	Vector Laboratories	1: 500	ICH
Maus IgG	Alexa-488	Ziege	Molecular Probes	1: 1000	ICC
Maus IgG	Alexa-546	Ziege	Molecular Probes	1: 1000	ICC
Kaninchen IgG	Alexa-488	Ziege	Molecular Probes	1: 1000	ICC
Kaninchen IgG	Alexa-546	Ziege	Molecular Probes	1: 1000	ICC

2.1.6 Plasmide

Plasmid	Eigenschaft	Herkunft
CA-MEK1-Flag	konstitutiv aktives MEK1-Konstrukt; Flag-markiert	AG Ölschläger, Uni Tübingen
GFP	Plasmid, welches GFP (Grün-Fluoreszierendes-Protein) exprimiert	Amaxa
Egr1-Luc	Luziferase-Reportergenkonstrukt; dem Luziferasegen ist der <i>Egr-1</i> Promotor vorangeschalten	AG Knöll
(mSm)2-Luc	Luziferase-Reportergenkonstrukt mit SRF-Bindestelle und deletierter TCF-Bindestelle im <i>c-Fos</i> Promotor	Bilge Ergin; AG Nordheim
(TSm)2-Luc	Luziferase-Reportergenkonstrukt mit TCF-Bindestelle und SRF-Bindestelle im <i>c-Fos</i> Promotor	Bilge Ergin; AG Nordheim
(Tmm)2-Luc	Luziferase-Reportergenkonstrukt mit TCF-Bindestelle und deletierter SRF-Bindestelle im <i>c-Fos</i> Promotor	Bilge Ergin; AG Nordheim
pUC18	Auffüllvektor	Biocompare
pCMV β	Reportergen, das für β -Galactosidase kodiert	Clontech
Sema3A	Sema3A-exprimierendes Konstrukt	AG Knöll

2.1.7 Mausstämme

<i>CamKIIα-iCre</i>	AG Prof. Dr. G. Schütz, DKFZ Heidelberg
<i>C57/Bl6</i>	AG Prof. Dr. B. Knöll, Uni Tübingen
<i>EphA7^{null}</i>	Prof. Dr. U. Drescher, KCL, London
<i>Srf(flex1neo/flex1neo)</i>	AG Prof. Dr. A. Nordheim, Uni Tübingen
<i>Srf(flex1neo/flex1neo) CamKIIα-iCre</i>	AG Prof. Dr. A. Nordheim, Uni Tübingen

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Herstellung primärer Zellkulturen der Maus

2.2.1.1.1 Säurevorbehandlung von Deckgläschen

Für immunzytochemische Färbungen wurden Primärneurone auf Poly-L-Lysin (PLL) und Laminin beschichteten Deckgläschen (DG) kultiviert. Zuvor jedoch mussten die Deckgläschen einer Säurebehandlung unterzogen werden, um maximale Sterilität der Deckgläschen und eine bessere Haftung des PLL zu gewährleisten. Hierfür wurden diese für 1 h in 2 M NaOH überführt und im Folgenden 3 x mit Wasser gewaschen. Danach folgte eine Inkubation in HNO₃ (70 %) für mindestens 3 Tage und ein anschließender dreimaliger Waschschrift mit H₂O. Danach wurden die DG für mind. 1h in 9 M Salzsäure (37 %) gelegt und anschließend innerhalb von 24 h zehn Mal mit H₂O gewaschen. Als letzten Schritt wurden sie in 100 % EtOH überführt und 1 x mit H₂O gewaschen. Die Aufbewahrung der DG erfolgte in 70 % EtOH, bis sie kurz vor dem Gebrauch luftgetrocknet wurden.

2.2.1.1.2 Beschichtung von Zellkulturschalen und Deckgläschen mit Poly-L-Lysin und Laminin

Die säurevorbehandelten Deckgläschen und Zellkulturschalen (4-, 6- und 24-Loch) wurden zuvor für 5 min unter UV-Licht sterilisiert. Anschließend erfolgte die Beschichtung der Deckgläschen mit 100 µg/ ml PLL in Boratpuffer für 1 h bei 37°C. Zellkulturschalen wurden mit 10 µg/ ml PLL in Boratpuffer beschichtet. Danach erfolgte ein dreimaliger Waschschrift mit H₂O. Anschließend wurden die Deckgläschen mit 20 µg/ml und die Zellkulturschalen mit 2 µg/ ml Laminin in HBSS beschichtet. Nach einer Inkubation bei 37°C für mindestens 2 h wurde 3 x mit HBSS gewaschen. Die Deckgläschen wurden in die entsprechenden Zellkulturschalen (4- oder 24-Loch) transferiert. Die Zellkulturplatten und DG wurden dann bis zum Gebrauch (etwa 2h) in DMEM/ 10 % Pferdeserum bei 37°C inkubiert. Direkt vor dem Gebrauch wurde DMEM/ 10 % Pferdeserum gegen NMEN/B27 mit 5 µg/ µl Gentamicin ausgetauscht.

2.2.1.1.3 Präparation und Kultivierung primärer neuronaler Kulturen

Für diese Arbeit wurden neben hippocampaler Zellkultur auch kortikale und cerebellarer Neurone verwendet. Die Herstellung hippocampaler Primärkulturen erfolgte aus 1-2 Tage alten Mäusen (P1 = postnataler Tag 1). Wurden Kulturen aus cerebellarem Gewebe angefertigt, so wurden P3-P7 Mäuse verwendet. Kortikale Kulturen wurden von E17,5 Mäuseembryonen angefertigt. Hierzu wurde das Muttertier geopfert und die Embryonen entnommen.

Die Embryonen sowie P1-P7 Mäuse wurden dekapitiert, der Kopf in kaltes PBS überführt und bis zur Präparation auf Eis gelagert. Für die Genotypisierung wurde die Schwanzspitze abgeschnitten und in Schwanzlysepuffer überführt.

Die Präparation des Kortex beginnt mit der Öffnung der Schädeldecke durch zwei seitliche Schnitte. Diese wurde entfernt und das Gehirn konnte vorsichtig herausgehoben werden und in eine 3 cm Zellkulturschale mit vorgewärmten HBSS überführt werden. Dann wurden das optische Tektum und das Cerebellum durch einen Koronalschnitt entfernt. Anschließend wurden die beiden Cortices durch einen Sagittalschnitt voneinander getrennt und der Riechkolben sowie das Striatum abgeschnitten. Der ventrale Teil des Kortex wurde entfernt und der dorsale Teil mit Hippocampus von Hirnhäuten befreit. Die isolierten Cortices wurden bis zur Beendigung aller zu präparierenden Mäuse in HBSS überführt. Für hippocampale Kulturen wurde der Hippocampus freigelegt und herauspräpariert. Die bananenförmige Struktur wurde ebenfalls in HBSS überführt und dort gelagert, bis alle Hippocampi präpariert waren. Analog verhielt es sich mit der Präparation des Cerebellum.

Das isolierte Gewebe wurde anschließend mit einem Skalpell gedrittelt und für 10 min bei 37°C trypsinisiert. Durch zweimaliges Waschen mit HBSS wurde die Trypsinisierung gestoppt. Danach wurde das HBSS vollständig abgenommen und das Gewebe in 1ml vorgewärmtes DMEM/10 % Pferdeserum aufgenommen. Anschließend erfolgte eine Vereinzelung der Zellen durch Triturieren mit Pasteur-Pipetten, die unterschiedliche Öffnungsdurchmesser aufwiesen. Die Spitze der zuerst verwendeten Pipette hatte einen Durchmesser von 1 mm (voller Durchmesser). Der Durchmesser der Spitze der folgenden Pipette wurde durch

Abflammen zuvor verkleinert, so dass die Öffnung schmaler wurde (halber Durchmesser).

Das Gewebe wurde zuerst für 1 min mit einer Pipette mit vollem Durchmesser, anschließend für 1 min mit halbem Durchmesser trituriert. Danach wurden die Zellen 5 min bei 600 rpm zentrifugiert, anschließend der Überstand verworfen und das Zellpellet in 500 µl NMEN/ B27 resuspendiert. Dann wurde die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen je nach Bedarf auf Deckgläschen oder Zellkulturschalen ausplattiert. Auf DG wurden ca. $1 \times 10^4 - 5 \times 10^4$ Zellen/ Loch ausplattiert und in Zellkulturschalen $2,5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ Zellen/ Loch ausgesät. Die Primärneurone wurden 1-3 Tage bei 37°C, 5 % CO₂ in NMEM/ B27 kultiviert.

2.2.1.2 Elektroporation primärer Neurone der Maus

Die Elektroporation stellt ein sehr effektives transientes Transfektionsverfahren dar, welches das Einschleusen von DNA in gewünschte Zellen ermöglicht. Das Verfahren beruht auf einem elektrischen Feld, das in der Regel durch einen schnell entladenden Kondensator erzeugt wird. Hierdurch werden in der behandelten Zellmembran für Millisekunden die Poren geöffnet. Die Poreninduktion bedingt einen Verlust der Semipermeabilität der Zellmembran. Die vorher zugefügte freie Plasmid-DNA kann nun ins Zellinnere aufgenommen und in den Zellkern eingeschleust werden.

In Vorbereitung für die Elektroporation wurden 3 µg entsprechender DNA vorbereitet und zusammen mit der Nucleofector Lösung bis zur Elektroporation auf Eis aufbewahrt.

Das isolierte Gewebe wurde ebenso behandelt wie in 2.2.1.1.3 beschrieben. Eine andere Vorgehensweise ergab sich jedoch nach dem Abzentrifugieren der Zellen und Resuspendieren des Pellets in NMEN/B27. Im Folgenden wurden die Zellen erneut bei 600 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde die DNA sowie die Nucleofector Lösung auf RT gestellt. Der Überstand der abzentrifugierten Proben wurde dann so komplett wie möglich abgenommen. Im Folgenden wurde auf den ersten Ansatz 200 µl Mouse Nucleofector Lösung gegeben und das Pellet durch dreimaliges Auf- und Abpipettieren gelöst. 100 µl

wurden entnommen und mit dem vorbereiteten DNA-Ansatz vermischt. Der DNA-Nucleofector-Mix wurde in Elektroporationsküvetten luftblasenfrei überführt und elektroporiert (220mV, 5ms). Anschließend wurden mit einer Plastikpipette elektroporierten Zellen in 400 µl vorgewärmtes DMEM/ 10 % HS aufgenommen und die gewünschte Menge Zellen auf Poly-L-Lysin und Laminin beschichteten 4-, 6- oder 24-Loch-Platten ausgesät und 2 h in DMEM/ B27 bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert. Es folgte danach ein Wechsel auf NMEM/ B27. Für den Luziferase-Assay wurde nach weiteren 24h erneut das Medium gewechselt auf 1 x MEM/ 1% FCS, um die Zellen für die Stimulation auszuhungern. Die Transfektionseffizienz lag stets bei 20 – 40 %.

2.2.1.3 Stimulation der Primärkulturen mit Ephrin-A5 und/ oder BDNF

Kultivierte Primärneurone wurden durch Zugabe von rekombinantem humanem BDNF (Endkonzentration 100 ng/ ml für Luziferaseassay, 10 ng/ µl für die Herstellung von Proteinlysaten und Wachstumskegelkollapsassay und 2,5 ng/ µl für die Untersuchung der Genexpression mittels RT-PCR) oder rekombinantem Ephrin-A5-Fc ins Kulturmedium stimuliert. Ephrin-A5 wurde hierzu vor der Stimulation 30 min mit einem Antikörper inkubiert, der gegen den Fc-Teil gerichtet ist. Dadurch bilden sich oligomere „Ephrin-A5-Cluster“. Es wird dadurch eine Wirkungsverstärkung von Ephrin-A5 auf die Zellen erzielt (Davis et al., 1994). Als Endkonzentration für Ephrin-A5 wurden, wenn nicht anders indiziert, 1 µg/ ml und für den Fc-spezifischen IgG Antikörper 10 µg/ml gewählt.

2.2.1.4 Stimulation kortikaler Primärneurone mit Semaphorin3A-Überstand

Für die Stimulation kortikaler Neurone mit Semaphorin3A wurde zuerst ein Semaphorin3A-Expressionsvektor in HEK293 Zellen transfiziert (siehe 2.2.1.12.3). Als Kontrolle diente ein GFP-Expressionsvektor. Nach 2 d Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ wurden der Semaphorin-Überstand und GFP-Kontrollüberstand abgenommen und sofort auf die zu stimulierenden Zellen gegeben.

2.2.1.5 Stimulation der kortikalen Primärneurone mit Phosphataseinhibitoren

Für die biochemische Untersuchung der Wirkungsweise von Ephrin-A5 wurden kortikale Neurone mit verschiedenen Phosphataseinhibitoren vorbehandelt. Hierfür wurden die Substanzen 15 Minuten vor der Zugabe des Lenkungsmoleküls direkt in das Medium appliziert. Natriumorthovanadat (ein Tyrosin-Phosphataseinhibitor) wurde mit einer finalen Konzentration von 200 μM , Okadainsäure (ein Serin/Threonin-Phosphataseinhibitor) mit einer finalen Konzentration von 200 nM und der Breitspektrum-Phosphataseinhibitor PhosStop in 1-facher Konzentration eingesetzt.

2.2.1.6 Organotypische Schnittkulturen des Hippocampus der Maus

2.2.1.6.1 Herstellung hippocampaler Schnitte der Maus mittels Interface-Methode

Die Herstellung der organotypischen Schnittkultur (Übersichtsschemata siehe **Abb. 2.1**) erfolgte nach der von Stoppini beschriebenen *Interface*-Methode (Stoppini et al., 1991). Für Experimente, die der Erforschung der Unterschiede in der Entwicklung zwischen SRF-defizienten und Wildtypmäusen dienen, wurden 2-14 Tage alte (P2-P14) Mäuse verwendet. Für die Untersuchungen der Wirkungen von BDNF und Ephrin-A5 auf das Auswachsen der Moosfasern des Hippocampus wurden ausschließlich P5-P6 Wildtypmäuse verwendet.

Hierfür wurden die Tiere unter semisterilen Bedingungen dekapitiert und die Kopfhaut sowie Schädeldecke entfernt. Anschließend wurden die Hippocampi vorsichtig herauspräpariert und in eine Petrischale mit eiskaltem HBSS überführt. Bis zum Anfertigen der Schnitte wurden die Hippocampi in HBSS auf Eis gelagert.

Die Anfertigung der Schnittkulturen erfolgte mit dem Gewebeschnaider. Hierzu wurde der freipräparierte Hippocampus auf die Schneideplatte transferiert und senkrecht zur Schneideklinge ausgerichtet. Diese wurde zu Beginn mit Ethanol desinfiziert, ebenso die Schneideplatte, welche nach der Desinfektion einmal mit HBSS abgespült wurde. Es wurden 350 μm dicke Transversalschnitte angefertigt, welche sofort nach dem Schneiden in eiskaltes Präparationsmedium überführt wurden. Falls notwendig, wurden die Schnitte mittels eines Skalpell und einer

Pinzette voneinander getrennt. Bis zu 10 Schnitte wurden dann zügig auf die Membran des Zellkulturinserts platziert und überschüssiges Medium um die Schnitte herum möglichst vollständig mit einer Pipette abgesogen. Für diesen Schritt wurde der Luftstrom der Zellkultur ausgeschaltet, um ein verfrühtes Austrocknen der Schnitte zu verhindern. Die Inserts wurden vorher in eine mit 1 ml Kulturmedium gefüllte 6-Loch-Platte gelegt und bei 37 °C, 5% CO₂ vorinkubiert. Nach erfolgreicher Platzierung der Schnitte auf die Membran wurden die Kulturen für mindestens 6h bei 37 °C, 5% CO₂ inkubiert, bevor nächste experimentelle Schritte unternommen wurden. Dies verbesserte wesentlich das Kultivieren der hippocampalen Schnittkulturen.

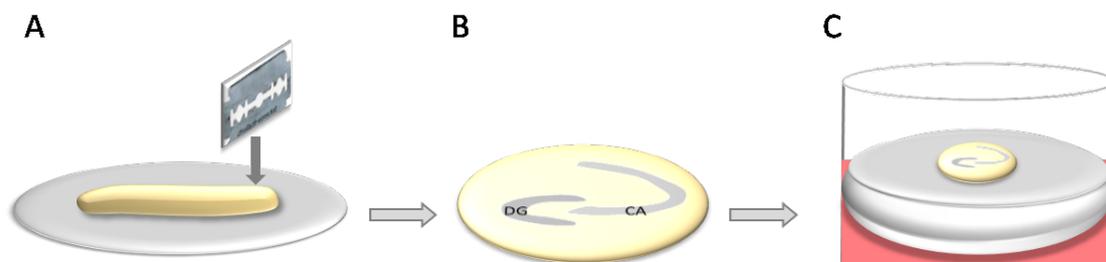


Abb.2.1. Herstellung organotypischer Schnittkulturen

(A) Senkrechtes Ausrichten des Hippocampus auf dem Schneidebrett und Anfertigen von Transversalschnitten mittels eines Gewebeschniders.

(B) Schematische Darstellung eines erhaltenen hippocampalen Schnittes.

(C) Platzierung des hippocampalen Schnittes auf die Membran eines Zellkulturinserts. Das Insert befindet sich in einem mit 1ml Medium gefüllten Loch einer 6-Loch-Platte.

2.2.1.6.2 Anfärben der Moosfasern in der hippocampalen Schnittkultur

Bei Kurzzeitexperimenten (2-3 Tage) wurden am selben Tag der Anfertigung der Schnittkulturen die Moosfasern mittels einer Injektion des lipophilen Markierungsfarbstoffes Dil angefärbt. Dieser wurde mit Hilfe einer dünnen Glaskapillare in den Gyrus dentatus sowie in den Hilus injiziert (siehe Abb. 2.2). Bei Langzeitexperimenten (7-14 Tage) erfolgte die Injektion zwei Tage vor Stopp des Experimentes. Prinzipiell konnte ein Anfärben der Moosfasertrakte schon 6 h nach Injektion des Farbstoffes notiert werden.

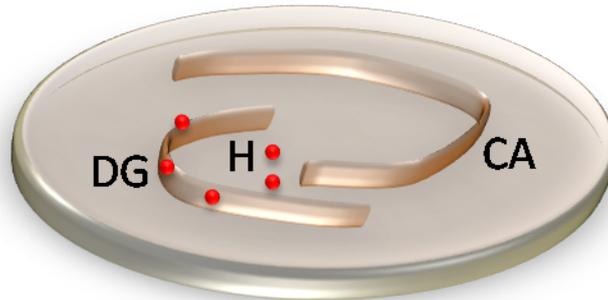


Abb. 2.2. Anfärben der Moosfasertrakte in der hippocampalen Schnittkultur.

Das Anfärben der Schnitte erfolgt mittels einer Glaskapillare. Rote Punkte zeigen den lipophilen Markierungsfarbstoff Dil. Der Farbstoff wurde in den Gyrus dentatus sowie in den Hilus appliziert.

DG = Gyrus dentatus; H = Hilus; CA = Cornu Ammonis (Ammonshorn)

2.2.1.6.3 Stimulation der Schnittkulturen

Für die Untersuchung der Wirkungen von BDNF und Ephrin-A5 auf das Auswachsen der Moosfasern wurden die Kulturen etwa 6 h nach dem Anfärben mit den Lenkungsmolekülen stimuliert. Die Zugabe der Substanzen erfolgte als direkte Badapplikation in das Medium, wobei eine finale Konzentration von 1 µg/ml oligomerisiertes Ephrin-A5 und/ oder 10 ng/ml BDNF eingesetzt wurde. Die Stimulation wurde nach 24 h wiederholt. Die Gesamtkultivierungszeit für diesen experimentellen Aufbau betrug 2 Tage.

2.2.1.6.4 Kultivieren der Schnittkulturen

Das Kultivieren der Schnittkulturen erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ in 1 ml Kulturmedium. Die Inkubationszeit der Ephrin-A5 und/ oder BDNF stimulierten WT-Schnitte betrug 2 Tage. Für das Langzeitexperiment, welches der Untersuchung der Moosfaserfehlleitung in SRF-defizienten Mäusen galt, wurde das Kulturmedium alle 3 Tage gewechselt.

2.2.1.6.5 Fixierung der hippocampalen Schnittkulturen

Um die Schnitte erfolgreich zu fixieren, wurde zuerst das Medium aus der 6-Loch-Platte entfernt. Im Folgenden wurde 1 ml einer Fixierlösung, bestehend aus 4% PFA/ 5% Sucrose/ PBS, in die 6-Loch-Platte gefüllt und das Insert darauf platziert. Der

Plattendeckel wurde wieder aufgesetzt, um ein mögliches Austrocknen von oben zu verhindern. Dieser Schritt ist essentiell, da sich die Schnittkulturen sonst im folgenden Fixierschritt von der Membran ablösen würden. Nach einer 5-minütigen Inkubation wurde dann vorsichtig 1 ml der Fixierlösung auf die Insertmembran gegeben und für weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Fixierlösung abgenommen und sowohl unterhalb als auch oberhalb des Inserts vorsichtig mit 1 ml PBS gewaschen. Nach der Abnahme des PBS wurde zur Anfärbung der Zellkerne jeweils 1 ml DAPI oberhalb und unterhalb des Insert gegeben und 5 Minuten inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift mit wurde das Insert möglichst vollständig von PBS befreit, aus der Lochplatte entnommen und auf eine dunkle Unterlage transferiert. Mittels eines Skalpell und einer Pinzette wurden nun die hippocampalen Schnittkulturen aus dem Insert herausgeschnitten und vorsichtig auf einen Objektträger übertragen. Möglichst zügig wurde dann mit etwa 500 µl Moviol eingebettet, die Schnitte 1 d bei RT im Dunkeln gelagert und bis zur mikroskopischen Auswertung bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.1.7 Immunhistochemische Färbung auf Vibratonschnitten

Um die Rolle des EphA7-Rezeptors in der Entwicklung des Hippocampus zu untersuchen, wurden immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Dafür wurden 3 Wochen alte *Epha7*-deletierte, wie auch WT-Mäuse, verwendet. Die Mäuse wurden dekapitiert und das Gehirn herauspräpariert. Das Gewebe wurde dann für 1 d bei 4 °C in 4 % PFA/ PBS auf einem Wippgerät inkubiert. Nach der Fixierung wurden die Gehirne in 4 % Agarose/ PBS eingebettet, wobei man in ein Loch pro 6-Lochplatte je ein Gehirn platzierte. Im Folgenden wurden 50 µm dicke Vibratonschnitte angefertigt und diese in eiskaltem PBS in einer 24-Lochschale gesammelt. Um eine optimale Färbung zu gewährleisten, wurden nicht mehr als 4 Schnitte in ein Loch transferiert. Nach dem Anfertigen und Sammeln aller Schnitte konnten diese dann dreimal für jeweils 5 min mit PBST gewaschen werden. Da biotinylierte Sekundärantikörper zu verwenden waren, musste zunächst die endogene Peroxidase zerstört werden. Hierzu wurden die Schnitte 15 min bei RT in einer „Quenching“-Lösung inkubiert. Nach anschließendem 3 x 5-minütigen Waschen in PBS erfolgte eine 30-minütige Inkubation der Schnitte in

Blockierungslösung. Anschließend wurde der entsprechende Antikörper in Blockierungslösung verdünnt und die Schnitte ü/ N bei 4 °C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte 3 x für 15 min in PBST gewaschen und darauffolgend der entsprechende Sekundäantikörper für 1h bei RT in Blockierungslösung hinzugegeben. Danach erfolgte ein 3 x 15-minütiger Waschschrift mit PBST, bevor das ABC-Reagenz bei RT für 30 min appliziert wurde. Nach einem erneuten 3 x 15-minütigen Waschschrift hat man das DAB-Substrat auf die Schnitte gebracht, etwa 10 Minuten im Dunkeln inkubiert und die Entwicklung des Signals unter dem Mikroskop beobachtet. Gestoppt wurde die Reaktion durch PBST. Mit DAPI wurde für 5 min gegengefärbt, dann einmal mit PBS gewaschen und die Schnitte letztendlich auf Objektträger vorsichtig aufgezogen. Nach der vollständigen Trocknung wurde mit Entellan eingedeckelt, getrocknet und bei 4 °C gelagert.

2.2.1.8 Immunzytochemische Färbung von Primärneuronen

Primärneurone wurden auf PLL und Laminin beschichteten Deckgläschen ausplattiert und für den gewünschten Zeitraum in Zellkulturplatten (4-Loch oder 24-Loch) inkubiert. Für die immunzytochemische Färbung wurde das Zellkulturmedium abgenommen und 1 x mit PBS gewaschen. Die Neurone wurden dann mit 4 % PFA/ 5 % Sucrose in PBS für 15 min fixiert und anschließend 3 x mit PBS gewaschen. Es folgte ein 5-minütiger Permeabilisierungsschritt mit 0,1 % Triton-X-100 (in PBS). Das Detergenz wurde abgenommen und die Zellen 2 x mit PBS gewaschen. Nach einer 30-minütigen Inkubation mit Blockierungslösung wurde der gewünschte Erstantikörper in entsprechender Verdünnung auf die Neurone gegeben (etwa 300 µl/ Loch) und 1 h bei RT oder ü/ N bei 4 °C inkubiert. Im folgenden Schritt wurde die Erstantikörperlösung abgenommen und dreimal mit PBS gewaschen. In Blockierungslösung entsprechend verdünnt, konnte nun der gewünschte Zweitantikörper auf die Zellen gegeben werden. Die Inkubation erfolgte für 1-2 h bei RT. Abschließend wurde mit PBS gewaschen (2 x) und für 5 min im Dunkeln mit DAPI oder TOPRO-3-iodid gegengefärbt. Nach letztmaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen auf Objektträger überführt, mit Moviol eingedeckelt und ü/N im Dunkeln getrocknet.

2.2.1.9 Nachweis der Ras-GAP-Kolokalisation mittels Immunzytochemie

2.2.1.9.1 *Detektion des aktivierten EphA-Rezeptors und Kolokalisation*

Die Aktivierung von membranständigen Rezeptoren hat oft eine Rekrutierung weiterer Signalmoleküle zur Folge. Um eine Untersuchung eines solchen Mechanismus zu ermöglichen, muss zunächst der aktivierte Rezeptor markiert werden. Hierzu erfolgte zunächst die Stimulation der Neurone mit Ephrin-A5 und BDNF/ Ephrin-A5 wie gehabt (siehe 2.2.1.3). Hierbei bindet das oligomerisierte Ephrin-A5-Fc an die EphA-Rezeptoren. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann 15 min mit 4 % PFA/ 5 % Sucrose in PBS fixiert. Nach einem zweimaligen Waschschrift mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem anti-Fc-gekoppelten Cy3-Antikörper im Dunkeln für 1 h bei RT. Dieser Antikörper konnte nun an das an EphA-Rezeptoren gebundene rekombinante Ephrin-A5-Fc binden. Über einen Zeitraum von 10 min wurden die Zellen dann 3-4 x mit PBS gewaschen. Es erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt für 5 min mit 4 % PFA/ 5 % Sucrose in PBS, um den Rezeptor-Ligand-Antikörperkomplex zu fixieren. Nach erneutem zweimaligen Waschen mit PBS konnte normal mit dem Protokoll für immunzytochemische Färbungen fortgefahren werden und unter der Verwendung entsprechender Antikörper auf die mögliche Rekrutierung von Signalmolekülen an den Rezeptor-Ligandenkomplex geschlossen werden.

2.2.1.9.2 *Detektion des nicht-aktivierten EphA-Rezeptors*

Im vorhergehenden Protokoll (2.2.1.9.1) beruhte die Färbung auf der Fixierung des durch Ephrin-A aktivierten Ephrin-A/ EphA-Rezeptorkomplexes mit anschließender Kopplung an den anti-Fc-gekoppelten Cy3-Antikörper. In der Kontrollsituation ohne Stimulus sowie unter der Applikation von BDNF werden jedoch die EphA-Rezeptoren nicht aktiviert. Folglich wurde ein leicht verändertes Protokoll im Vergleich zu 2.2.1.9.1. verwendet, um die EphA-Rezeptoren dennoch zu markieren. Zunächst erfolgte die Stimulation der Zellen mit BDNF oder blieben unstimuliert für die Kontrollsituation. Nach einem sich anschließenden Fixierungsschritt mit 4 % PFA/ 5 % Sucrose in PBS für 15 min bei RT folgte zweimaliges Waschen mit PBS. Danach wurden die Neurone für 30 min in BSA blockiert. Um nun die EphA-Rezeptoren zu markieren, wurden pro Ansatz eine Konzentration von 1 µg/ ml des

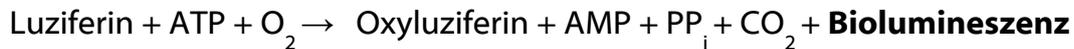
oligomerisierten Ephrin-A5-Fc hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es erfolgte dann eine Inkubation mit dem anti-Fc-gekoppelten Cy3-Antikörper für 1 h bei RT mit anschließendem dreimaligem Waschen mit PBS. Nach 5-minütigem Fixieren mit 4 % PFA/ 5 % Sucrose in PBS konnte wieder mit dem Protokoll für immunzytochemische Färbungen fortgefahren werden.

2.2.1.10 Alkalische Phosphatase-Färbung auf Kryostatschnitten

Für die Alkalische Phosphatase (AP)-Färbung wurden die Gehirne von *Srf*-deletierten und Wildtyp-Mäusen verwendet, wobei drei unterschiedliche Entwicklungszeitpunkte gewählt wurden (P3, P6 und P14). Nach der Präparation des Gewebes wurde dieses einmal in PBS gewaschen und in Tissue Tek eingebettet. Anschließend wurden etwa 25 µm dicke Kryostatschnitte angefertigt. Nach dem Antrocknen über Nacht bei RT folgte ein einminütiger Fixierungsschritt in 4 % PFA/ PBS. Zur Rehydrierung der Proben wurden diese dann 10 min in HBHA inkubiert. Danach wurde mit 15 nM AP-Fusionsproteinen (Knoll et al., 2001) für 2 h bei RT inkubiert. Hierfür wurde ein AP-EphA3 Konstrukt verwendet, um Ephrine nachzuweisen und ein AP-Ephrin-A5 Konstrukt, um EphA-Rezeptoren anzufärben. Es folgten vier Waschschrte in HBS für jeweils 5 min mit darauffolgender einminütiger Fixierung in einer Lösung bestehend aus 60 % Aceton, 3,7 % Formaldehyd und 20 mM HEPES pH 7,0/ HBS. Nach sechs weiteren Waschschrten in HBS für jeweils 5 min wurde durch eine einstündige Inkubation bei 65 °C in HBS die endogene alkalische Phosphatase inaktiviert. Anschließend wurden die Zellkerne für 5 min in DAPI / HBS gegengefärbt. Der nächste Schritt verlangte eine 10 minütige Inkubation der Proben in AP-Puffer. Anschließend wurden die Objektträger mit der BCIP/ NBT-haltigen AP-Substratlösung (etwa 500 µl/ Objektträger) im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde mit PBS gestoppt und abschließend in Moviol eingedeckelt, 1 d bei RT getrocknet und bis zur Auswertung bei 4 °C gelagert.

2.2.1.11 Firefly Luziferaseassay in Primärneuronen

Luziferase ist ein Enzym von 61 kDa und katalysiert in Gegenwart von molekularem Sauerstoff und unter ATP-Verbrauch die biolumineszente Oxidation von Luziferin zu Oxyluziferin.



Hierzu wurden $2,5 \times 10^5$ Primärneurone mit einem Reporter-genkonstrukt transient transfiziert und in einer 24-Lochplatte kultiviert (siehe 2.2.1.2). Bei den verwendeten Konstrukten steht die Expression des Luziferasegens unter der Kontrolle des Zielgen-Promotors (z.B. *c-Fos* oder *Egr1*). Dadurch ist eine Untersuchung der Luziferase-Transkription durch die Stimuli Ephrin-A5 und BDNF möglich. In allen Ansätzen wurde ein β -Galactosidase-Reporter-genkonstrukt kotransfiziert, das zu der Expression von β -Galactosidase führt. Die nachfolgende Bestimmung der β -Galactosidaseaktivität innerhalb des gleichen Zelllysates diente der Kontrolle der Transfektionseffizienz und Normalisierung der Luziferaseaktivität. Hierzu wurde der Quotient aus Firefly Lumineszenz/ β -Galactosidase Lumineszenz gebildet.

Der eigentliche Luziferasenachweis erfolgte in einem Luminometer nach Substratzugabe. Die Quantifizierung der Lichtemission in den Zelllysaten ist somit ein indirektes Maß für die Aktivität des Reporter-genplasmids.

Für den Luziferaseassay wurden die Cortices wie in 2.2.1.1.3 isoliert und kultiviert. Am dritten Tag der Kultivierung wurden die Zellen für unterschiedliche Zeitspannen stimuliert, wie in 2.2.1.3 beschrieben. Um die Stimulation zu stoppen wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 200 μ l Zelllysispuffer/ Loch lysiert. Anschließend wurde die 24-well Platte bei -80°C für mindestens 1h eingefroren und erst direkt vor dem Messen wieder aufgetaut.

Für den Firefly Luziferaseassay wurden 50 μ l Zelllysat in ein transparentes Röhrchen überführt. Direkt vor der Messung erfolgte der Zusatz von 300 μ l Firefly Luziferase Messpuffer (mit 5 mM ATP) und 100 μ l Luziferin Lösung. Sogleich wurde kurz gevortext und die Lumineszenz bei 540 nm für 10 s gemessen.

Für den β -Galactosidase Assay wurden 20 μ l des Zelllysates in ein transparentes Röhrchen überführt und mit 100 μ l β -Gal Reaktionspuffer versetzt. Der Ansatz wurde kurz gevortext und anschließend 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Direkt vor der

Messung wurden 300 µl β-Gal Stopplösung hinzupipettiert, der Ansatz kurz gevortext und die Lumineszenz für 10 s gemessen. Von jedem Zelllysate wurden stets Duplikate gemessen, von denen der Mittelwert gebildet und für weitere Berechnungen verwendet wurde.

2.2.1.12 Zellkultur der HEK293-Zelllinie

2.2.1.12.1 In flüssigem Stickstoff aufbewahrte HEK298-Zellen auftauen

Für die Zellkultur wurden HEK293-Zellen kurz im Wasserbad aufgetaut und die Zellen anschließend in 5 ml vorgewärmtes Zellkulturmedium überführt. Anschließend wurden die Zellen bei 1000 rpm für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde im Folgenden abgenommen, das Pellet in 10 ml vorgewärmten Medium resuspendiert und je nach Pelletgröße 1:5 in 75cm² Zellkulturflaschen gesplittet.

2.2.1.12.2 Zellkulturroutine

Die Zellen wurden, je nach Konfluenz, alle zwei bis drei Tage gesplittet. Hierzu wurde das Zellkulturmedium, sowie PBS und Trypsin vorgewärmt. Im Weiteren wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen abgenommen und die Zellen 1 mal mit 10 ml PBS gewaschen. Das PBS wurde danach abgenommen und 1 ml Trypsin auf die Kultur gegeben um das Ablösen der Zellen zu ermöglichen. Sobald sich die Zellen von der Flaschenoberfläche gelöst hatten, wurden die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen und je nach Bedarf gesplittet. Für Transfektionen benötigte Zellen wurden vor dem Ausplattieren zentrifugiert (5 min, 1000 rpm), der Überstand abgenommen und das Pellet in 10 ml vorgewärmten Zellkulturmedium resuspendiert.

2.2.1.12.3 Transfektion von HEK293-Zellen mittels PromoFectin

Neben der Elektroporation stellt die Transfektion mittels Transfektionsreagenz PromoFectin eine weitere Möglichkeit dar, DNA effektiv in die gewünschten Zellen einzuschleusen. Bei PromoFectin handelt es sich um ein nicht-liposomales Polymer. Es verdichtet die DNA zu positiv geladenen Komplexen, welche dann an die negativ

geladene Zelloberfläche binden. Durch Endozytose wird die DNA schließlich in die Zelle aufgenommen.

Für die Transfektion der HEK293-Zellen wurde zunächst eine adäquate Menge an Zellen in 6-Lochplatten (etwa 5×10^5 Zellen/ Loch) ausplattiert und bis zu einer Konfluenz von 50 – 60 % wachsen gelassen. Die eingesetzte Menge an DNA betrug pro Loch 3 μg und an PromoFectin 6 μl . Zuerst wurde die DNA mit einer entsprechenden Menge (100 μl / Loch) an serumfreien Opti-MEM vermischt, kurz gevortext und herunterzentrifugiert. In einem zweiten Ansatz wurde die gleiche Menge Opti-MEM wie im ersten Ansatz mit PromoFectin versetzt, vorsichtig gevortext und kurz herunterzentrifugiert. Beide Ansätze wurden im nächsten Schritt vermischt und für 15-30 min bei RT inkubiert. Während der Inkubation wurde das Zellkulturmedium abgenommen und 2 ml Opti-MEM/ Loch vorgelegt. Der PromoFectin/ DNA-Mix wurde anschließend tropfenweise auf die Zellen gegeben und die Zellen 12-48 h bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

E. coli Zellen vom DH5 α -Stamm wurden in 2 ml LB-Medium ohne Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37°C bei 225 rpm inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden 100 μl von der Übernachtskultur in 100 ml LB-Medium angeimpft und wachsen gelassen, bis eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht wurde. Im Folgenden wurde die Kultur in Falconröhrchen für 5 min bei 3500 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dann verworfen und das Pellet auf Eis in 5 ml frisch angesetztem, kalten Kompetenzpuffer resuspendiert. Nach einer Inkubationsphase von 10 min auf Eis wurden entsprechende Aliquots auf Trockeneis eingefroren und abschließend bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.2.2 Transformation von Bakterien

Für die Transformation wurden chemisch kompetente DH5 α -Zellen mit einer Transformationseffizienz von 1×10^7 Kolonien pro μg des eingesetzten Vektors verwendet. Hierzu wurden die Zellen langsam auf Eis aufgetaut. Währenddessen

wurden 100 ng des entsprechenden Plasmids in 90 µl KCM gegeben. Im Anschluss wurden 90 µl kompetente Zellen zu der DNA in KCM gegeben und vorsichtig vermischt. Danach wurden die Zellen 15 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein 2 minütiger Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad. Im Folgenden wurden die Zellen mindestens 2 min auf Eis inkubiert. Danach wurde 1 ml vorgewärmtes LB-Medium ohne Antibiotika hinzugegeben und für 45 min bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Darauf folgend wurden die Zellen bei 1000 rpm für 2 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert. Jeweils 10 und 90 µl der Zellen wurden auf 10 cm LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C in invertierter Position inkubiert.

2.2.2.3 Plasmidisolierung

Für die Plasmidisolierung von 5 ml Tageskulturen erfolgte die Plasmidpräparation mit dem Plasmid Miniprep Kit von Peqlab und bei 100 ml Übernachtskulturen mittels dem Qiafilter® Plasmid Midi Kit von QIAGEN. Alle Schritte wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Das erhaltene DNA-Pellet wurde abschließend in einer adäquaten Menge Eluierungspuffer (200–500µl) gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.2.4 RNA-Isolierung aus neuronaler Primärzellkultur

Die Isolierung der mRNA aus der Zellkultur von neuronalen Primärneuronen wurde mit dem *RNeasy® Mini Kit* von QIAGEN durchgeführt. Alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Nach einer Kultivierung der Neurone für 2 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das Kulturmedium vollständig abgenommen und 350 µl des komplettierten RLT-Lysepuffer auf die Zellen zugegeben. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen von der Oberfläche gelöst und das Lysat zur Homogenisierung auf eine *QIAshredder™* Säule geladen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 13.0000 x g. Dann wurde der Säulendurchfluss in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 350 µl 70 % Ethanol hinzugegeben und der Ansatz durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren sorgfältig vermischt. Die Probe wurde anschließend auf eine *RNeasy Mini Spin* Säule geladen und für 15 s bei 10.000 x g

zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde verworfen und es folgten die Waschschrirte. Hierfür wurde 700 µl RW1 auf die Säule pipettiert und 15 s bei 10.000 x g durch die Säule zentrifugiert. Danach wurde der Säulendurchfluss verworfen, 500 µl RPE + EtOH auf die Säule pipettiert und 15 s bei 10.000 x g zentrifugiert. Dieser Waschschrirte wurde wiederholt. Anschließend wurde durch einminütiges Zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit, die Zentrifugensäule vollständig getrocknet. Die Säule wurde abschließend in ein neues RNase-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch zwei aufeinanderfolgende Zentrifugationsschrirte für 1 min bei 10.000 x g in einem Gesamtvolumen von 50 µl sterilem DEPC-dH₂O eluiert.

2.2.2.5 RNA-Isolierung aus neuronalem Gewebe der Maus

Zuerst wurde das gewünschte Gewebe, wie Cerebellum, Kortex oder Hippocampus heraus präpariert und möglichst ohne Flüssigkeit in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert, welches umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren wurde und anschließend bis zur RNA-Isolierung bei -80 °C gelagert wurde. Die Isolierung der mRNA aus Gesamtgewebe erfolgte ebenso wie unter 2.2.2.4. mittels dem *RNeasy® Mini Kit* von QIAGEN. Hierfür wurde das Gewebe mit 350 µl komplettierten RLT-Puffer versetzt und das Lysat mit Hilfe einer 20-gauge Injektionsnadel durch mehrfaches Hoch- und Herunterziehen der Spritze homogenisiert. Nach einem dreiminütigen Zentrifugationsschrirte bei 13.000 rpm wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und 350 µl 70 % EtOH hinzugefügt. Alle weiteren Schrirte entsprechen der in 2.2.2.4. beschriebenen Isolierung von RNA aus neuronaler Primärzellkultur.

2.2.2.6 DNaseI-Verdau

Um eine etwaige Kontamination während der RNA-Isolierung mit genomischer DNA zu beseitigen, wurde ein DNaseI-Verdau durchgeführt. Hierzu wurden zu 50 µl des RNA-Eluats 10 µl DNaseI-Puffer und 1 µl DNaseI hinzugegeben und der Ansatz für 30 min bei 37 °C inkubiert. Um das Enzym zu inaktivieren wurde die Probe im folgenden Schrirte für 20 min bei 65 °C erhitzt und danach sofort auf Eis gestellt.

Anschließend wurde die Reinheit und Konzentration der RNA photometrisch bestimmt.

2.2.2.7 Herstellung von cDNA

Die Reverse Transkription wird verwendet um einen komplementären DNA Strang (cDNA) von der Gesamt-RNA zu synthetisieren. Dieses Produkt ist wesentlich stabiler als die RNA und kann für weitere Experimente, wie die qRT-PCR, genutzt werden.

Für die Reverse Transkription wurde die Gesamt-RNA zuerst mit *Random Hexamers* (dN₆) inkubiert. Diese stellen Oligonukleotide dar, bestehend aus sechs zufällig zusammengesetzten Nukleinbasen und dienen der Reversen Transkriptase als Primer. Für die cDNA-Synthese wurden 1 µg RNA eingesetzt, der Ansatz mit 5 µl dN₆ versetzt und mit RNase freiem H₂O auf ein Gesamtvolumen von 40 µl gebracht. Der Pipettiermix wurde dann für 10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend sofort für mindestens 2 min auf Eis gelagert. Im weiteren Schritt wurde der Reaktionsmix hinzupipettiert, welcher die Reverse Transkriptase beinhaltet. Dieser setzte sich wie folgt zusammen:

Reagenzien	µl/ Ansatz
5x M-MLV-RT Puffer	12
dNTPs (10mM)	2
RNase Inhibitor (40U/µl)	0,5
M-MLV ReverseTranskriptase	0,5
Gesamtvolumen pro Ansatz	15

Dieser Ansatz wurde zuerst für 10 min bei RT und anschließend für 45 min bei 42 °C im Wasserbad inkubiert. Um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren erfolgte ein dreiminütiger Inkubationsschritt bei 99 °C. Die Proben wurden abschließend sofort auf Eis gestellt, aliquotiert und bei -20°C bis zum weiteren Gebrauch weggefroren.

Als Negativkontrolle wurden Ansätze pipettiert die im Reaktionsmix keine Reverse Transkriptase enthielten. Dadurch konnte in der späteren RT-PCR (siehe 2.2.2.9) überprüft werden, ob eine Kontamination mit genomischer DNA vorlag.

2.2.2.8 Semi-quantitative Real-Time PCR (RT-PCR)

Nach der Gesamt-RNA Isolierung, dem DNase-Verdau und der Reversen Transkription wurde die erhaltene cDNA für eine semi-quantitative Real-Time PCR benutzt. Diese Methode beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die RT-PCR ermöglicht eine genaue Quantifizierung der mRNA Menge.

Diese Methode wurde mit dem *ABI PRISM 7000 Sequence Detection System* (Applied Biosystems) durchgeführt. Die *7000 Systems SDS Software* (Version 1.2.3) wurde verwendet um den Verlauf der cDNA-Amplifikation aufzuzeichnen.

Die Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe eines DNA-Farbstoffes. In dieser Arbeit wurde dafür der Power SYBR® Green PCR Master Mix verwendet. Dieser Fluoreszenzfarbstoff interkaliert in doppelsträngige DNA, wodurch die Fluoreszenz dieser Farbstoffe ansteigt. Die Zunahme der Template-DNA korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus.

Die Auswertung erfolgte über die Ermittlung des Ct-Wertes (*cycle treshold* = „Schwellenwert-Zyklus“). Dieser Wert beschreibt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Je höher der Wert ist, desto weniger mRNA ist vorhanden.

Um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA auszugleichen, wurde eine interne Kontrolle verwendet. Als Standard wurden hierzu die Ct-Werte des Haushaltsgens Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) bestimmt, da dieses Gen von extrazellulären Stimuli weitgehend unbeeinflusst bleibt. Damit ergab sich für die Berechnung der relativen RNA Menge folgende Formel:

$$2^{-\Delta Ct} \quad \text{mit } \Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{GAPDH}}$$

Primer, cDNA und SYBR Green wurden in 96-well-Platten pipettiert und mit Folie versiegelt. Jeder Pipettieransatz umfasste ein Volumen von 10 µl. Um Pipettierungenauigkeiten zu verhindern, wurden Mastermixe angesetzt. Pro Bedingung wurden stets Dupletts angefertigt.

Pipettieransatz für die RT-PCR:

Reagenzien	µl/ Loch
Primer fw (10 µM)	0,3
Primer rev (10 µM)	0,3
ddH ₂ O	2,4
cDNA	2
SYBR green	5
Gesamtvolumen/ Ansatz	10

PCR-Programm:

50 °C	2 min	
95 °C	10 sec	
95 °C	15 sec	40 x
60 °C	1 min	
95 °C	15 sec	
60 °C	20 sec	
95 °C	15 sec	
4 °C	∞	

2.2.2.9 Mausgenotypisierungen

2.2.2.9.1 Lyse der Gewebebiopsien

Um für die Versuche Tiere mit dem erwünschten Genotyp zu erhalten, musste dieser zuerst bestimmt werden, bevor relevante Verpaarungen zusammengesetzt werden konnten. Hierzu wurde ein kleines kreisrundes Gewebestück des Ohrs ($\varnothing \approx 5 \text{ mm}^2$) mittels einer Lochstanze entfernt und in 150 µl Schwanzlysepuffer überführt. Der Ansatz wurde einem Proteinase K Verdau unterzogen und dafür über Nacht bei 55°C und 650 rpm geschüttelt.

Für die Bestimmung des Genotyps, der in Experimenten verwendeten Mäuse wurde jeweils die Schwanzspitze mit einem Skalpell abgetrennt, in 500 µl Lysepuffer überführt und ebenso dem Proteinase K Verdau unterzogen. Am darauffolgenden Tag wurden die Gewebebiopsien bei Raumtemperatur und 13000 rpm für 5 min abzentrifugiert. Anschließend wurden die erhaltenen Überstände in ein neues 1,5 ml- Reaktionsgefäß überführt und bei 4°C bis zur Genotypisierung gelagert.

2.2.2.9.2 PCR zur Bestimmung des Srf Genotyps

Die in 2.2.2.10.1 erhaltene genomische DNA diente für alle folgenden Genotypisierungen als Matrize. Bei den Genotypisierungen 2.2.2.10.3 sowie 2.2.2.10.4 wurde das sogenannte *Hot Start* Protokoll verwendet. Hierbei wurde die Polymerase erst während dem 80 °C Schritt zu den Ansätzen hinzupipettiert. In 2.2.2.10.5 wurde das Enzym hingegen gleich zu den Ansätzen gegeben, bevor das PCR-Programm gestartet wurde. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden

abschließend auf ein 2 %iges Agarosegel (siehe 2.1.4.4.2) aufgetragen, um die unterschiedlichen Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen. Das Gel wurde für etwa eine Stunde bei 120V laufen gelassen und die Banden mittels UV-Licht sichtbar gemacht.

Pipettierschema

Reagenzien	µl/ Ansatz
Wasser	36
10 x PCR Puffer	5
DMSO	2,5
dNTP's (10 mM)	1
Primer AW (10 µM)	1,5
Primer BW (10 µM)	1,5
Primer CW (10 µM)	0,5
genomische DNA	1,5
redHot Taq-Polymerase (5U)	0,5
Gesamtvolumen/ Ansatz	50

PCR-Protokoll

97,5 °C	10 min
80 °C	10 min
94 °C	2 min
94 °C	30 sec
65 °C	30 sec
72 °C	30 sec
72 °C	7 min
4 °C	∞

Bei *Srf*-Wildtypmäusen lag die zu erwartende PCR-Bande bei 600 bp, bei *Srf*-deletierten bei 530 bp. Heterozygote Tiere wiesen eine Bande bei 600 bp und 530 bp auf.

2.2.2.9.3 PCR zur Bestimmung des *CamKIIα-Cre* Genotyps

Pipettierschema

Reagenzien	µl/ Ansatz
Wasser	37,5
10 x PCR Puffer	5
dNTP's (10 mM)	1,2
Primer CreS (10µM)	1,2
Primer CreAS (10 µM)	1,2
Primer PCR3 (10 µM)	1,2
Primer PCR4 (10 µM)	1,2
genomische DNA	1
redHot Taq-Polymerase (5U)	0,5
Gesamtvolumen/ Ansatz	50

PCR-Protokoll

97,5 °C	10 min
80 °C	10 min
94 °C	2 min
94 °C	30 sec
65 °C	30 sec
72 °C	30 sec
72 °C	7 min
4 °C	∞

35 x

Die zu erwartende PCR-Kontrollbande nicht *CamKII α -Cre* transgenen Mäusen lief bei 500 bp. Bei transgenen Mäusen wurde hingegen zusätzlich eine PCR-Bande bei 300 bp erwartet.

2.2.2.9.4 PCR zur Bestimmung des *EphA7* Genotyps

Herstellung des Primermixes

Reagenzien	μ l/ Ansatz
Wasser	38,75
MDK1-WT (100 μ M)	1,25
MDK1-WT/MT (100 μ M)	5
MDK1-MT-neo (100 μ M)	5
Gesamtvolumen/ Ansatz	50

Pipettierschema

Reagenzien	μ l/ Ansatz
Wasser	38,1
10 x PCR Puffer	5
dNTP's (10 mM)	0,5
Primermix	4
genomische DNA	2
redHot Taq-Polymerase (5U)	0,5
Gesamtvolumen/ Ansatz	50

PCR-Protokoll

94 °C	4 min	} 35 x
95 °C	30 sec	
55 °C	30 sec	
72 °C	1 min 30 sec	
72 °C	4 min	
4 °C	∞	

Bei *EphA7*-Wildtypmäusen wurde eine PCR-Bande bei 620 bp erwartet. Bei *EphA7*-deletierten Mäusen sollte die Bande bei 270 bp und bei heterozygoten Tieren bei 620 und 270 bp laufen.

2.2.2.10 In-situ Hybridisierung

Ein effektives Verfahren zum direkten und spezifischen Nachweis von mRNA Expression stellt die in-situ Hybridisierung dar. Der direkte Nachweis von RNA in Gewebe und Zellen kann somit Auskunft über die Genexpression des zu untersuchenden Proteins geben.

Diese Methode umfasst die Herstellung der RNA-Sonde mittels *in-vitro* Transkription, Anfertigen der Kryostatschnitte, Hybridisierung, Waschen und Färbung. Für dieses Experiment wurden P14 alte SRF-defiziente und Wildtyp Mäuse verwendet.

2.2.2.10.1 *In-vitro* Transkription

Zuerst erfolgte die Linearisierung des entsprechenden Vektors. Hierzu wurden 5 µg des Plasmids in einem 100 µl Ansatz mit dem jeweiligen Restriktionsenzym ü/ N verdaut. 0,2 µg des Ansatzes wurden dann zur Kontrolle des Verdau auf ein Gel aufgetragen. Bei erfolgreichem Verdau wurde anschließend eine zweifache Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Hierzu wurde der verdaute Ansatz mit 100 µl Phenol-Chloroform versetzt, kurz gevortext, 2 min bei 15000 rpm, 4 °C zentrifugiert und die obere Phase abgenommen. Es folgte dann eine Chloroform-Extraktion. Zu dem Ansatz wurde gleiche Menge an Chloroform hinzugegeben, ebenfalls kurz gevortext, unter gleichen Bedingungen wie bei der Phenol-Chloroform-Extraktion zentrifugiert und ebenso die obere Phase abgenommen. Dieser Schritt wurde ebenso wiederholt. Als nächstes musste die DNA gefällt werden. Der Ansatz wurde mit 2,5 Volumen absoluten Ethanol sowie 1/10 Volumen Na-Acetat pH 5,2 versetzt, 30 min bei -80 °C inkubiert und anschließend 15 min bei 15000 rpm, 4 °C zentrifugiert. Durch Zugabe von 500 µl 70 % Ethanol pro Ansatz und 5 minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 15000 rpm wurde die Probe gewaschen. Nach möglichst vollständiger Flüssigkeitsabnahme wurde das Pellet luftgetrocknet und dann in 20 µl DEPC-versetztem Wasser (H₂O_{DT}) resuspendiert. Die Konzentration der erhalten DNA-Matrizenlösung wurde mittels eines Photometers bestimmt. Für die Durchführung der *in-vitro* Transkription ergab sich folgendes Pipettierschema, wobei die Reagenzien genau in jener Reihenfolge hinzugegeben wurden, wie aufgelistet:

Reagenzien	µl/ Ansatz
linearisierte DNA-Matrize	1 µg
H ₂ O _{DT}	auf 20 µl auffüllen
10 x Dig-RNA Markierungsmix	2 µl
10 x Transkriptionspuffer	2 µl
RNase-Inhibitor (Rnasin)	1 µl
RNA Polymerase (T3/ T7)	2 µl

Dieser Ansatz wurde 2 h bei 37 °C inkubiert und abschließend mit 2 µl 0,2 M EDTA_{DT} gestoppt.

Der folgende Schritt ermöglichte die Entfernung der nicht-eingebauten Nukleotide. Dafür wurde der gestoppte Reaktionsansatz mit 75 µl EtOH abs. und 5 µl LiCl_{DT} versetzt, 30 min bei -80 °C gefällt, 15 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 500 µl 70 % EtOH für 5 min bei 14000 rpm und 4 °C gewaschen. Unter dem Abzug erfolgte dann das Trocknen des Pellets. Die erhaltene RNA-Sonde wurde in 10 µl H₂O_{DT} resuspendiert, die Konzentration bestimmt und im Folgenden mit 9 µl Formamid versetzt. Adäquate Aliquots wurden angefertigt und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.2.10.2 Gewebevorbereitung und Anfertigung der Kryostatschnitte

Das zuvor freipräparierte Gewebe wurde vor dem Einbetten in einer Lösung aus 50% Sucrose und Gewebeeinbettmedium im Verhältnis 2:1 für 20 min inkubiert und danach eingebettet. Von dem frisch eingefrorenen Gewebe wurden mittels Kryostat 14 µm dicke Schnitte angefertigt. Nach einem 20 minütigen Trocknungsschnitt bei RT wurden die Schnitte auf dem Objektträger mit Fettstift umrandet und anschließend mit frisch angesetzter 4 %-iger PFA-Lösung für 10 min bei RT fixiert. Nach drei Waschschritten mit PBS für jeweils drei Minuten folgte ein Acetylierungsschritt. Hierfür wurden die Proben für 10 min bei RT mit frisch angesetztem Acetylierungspuffer inkubiert und danach dreimal für 5 min mit PBS gewaschen bevor, mit dem Prehybridisierungsschritt fortgefahren werden konnte.

2.2.2.10.3 Hybridisierung der RNA-Sonden mit den Gewebeschnitten

Das vom Waschen überschüssige PBS wurde mittels eines Tuches vorsichtig entfernt und 500 µl Hybridisierungspuffer auf den Objektträger gegeben. Der für diesen Prehybridisierungsschritt benötigte Hybridisierungspuffer wurde frisch angesetzt. Die Proben wurden für zwei Stunden in einer mit 5 x SSC equilibrierten Metallbox für 2 h bei RT inkubiert. Währenddessen wurden die RNA-Sonden vorbereitet, wobei hierfür die Originalsonde 1:10 in ddH₂O_{DT} vorverdünnt und dann 1:100 in Hybridisierungspuffer eingesetzt wurde. Die Sonden wurden dann für 5 min bei 80 °C im Wasserbad denaturiert und anschließend sofort auf Eis gelagert. Für

den eigentlichen Hybridisierungsschritt wurden 90 µl Hybridisierungspuffer mit der jeweiligen Sonde auf die Objektträger pipettiert, gebackene Deckgläschen darauf platziert und ü/N bei 72 °C inkubiert. Hierfür wurden die Proben in einer Metallbox platziert, welche mit etwa 75 ml einer Lösung aus 5 x SSC und 50 % Formamid equilibriert wurde. Hierbei war zu beachten, dass sich verschiedene Sonden möglichst in getrennten Metallboxen befanden.

2.2.2.10.4 Waschen und Färben der hybridisierten Proben

Zuvor wurden die für die Waschschrte benötigten Glasgefäße und Puffer (5 x SSC sowie 0,2 x SSC) ü/N bei 72 °C vorgewärmt. Der erste Waschschrst erfolgte bei 68 °C für 10 min in 5 x SSC. Die Objektträger wurden hierfür in Glasküvetten platziert, die Deckgläschen sollten bei diesem Schritt abfallen. Anschließend wurden die Objektträger für 30 min bei 68 °C in 0,2 x SSC gewaschen. Dieser Schritt wurde wiederholt. Der folgende Waschschrst erfolgte bei RT in 0,2 x SSC für 5 min. Danach wurden die Objektträger in eine Glasküvette mit B1-Puffer transferiert und dort 5 min gewaschen. Als Nächstes wurden die auf einem Metallgitter platzierten Objektträger mit etwa 1,5 ml einer Lösung aus B1-Puffer und 10 % FCS für 1h bei RT blockiert. Nach diesem Blockierungsschrst erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper ü/N bei 4 °C. Hierfür wurde ein Anti-Digoxigenin-Antikörper verwendet, an welchem alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Am nächsten Tag wurden drei Waschschrte für 15 min bei RT mit dem B1-Puffer durchgeführt. Das Protokoll sah als nächsten Schritt eine 5-minütige Equilibrierung der Objektträger in B3-Puffer vor. Letztendlich wurde die Substratlösung B4 (etwa 400 µl) auf die Proben gegeben. Diese reagierte mit der alkalischen Phosphatase, wobei sich um die Sonde ein dunkelvioletter Niederschlag bildete. Je nach Reaktionsgeschwindigkeit erfolgte im Dunkeln eine Inkubation von 6 h bis 3 Tagen, wobei die Substratlösung bis zu 3 mal gewechselt wurde. Gestoppt wurde die Reaktion mit TE-Puffer und eingedeckelt mit Immumount.

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Herstellung von Proteinextrakten

2.2.3.1.1 *Herstellung von Proteinextrakten aus neuronaler Primärkultur*

Die in 6-Well-Platten kultivierten Neurone wurden wie in 2.2.1.3 beschrieben stimuliert. Zum Stoppen der Stimulation wurden die Zellkulturplatten sofort auf Eis gestellt und 1 x mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde das PBS vollständig entfernt und 100 µl Lysispuffer pro Well gegeben. Nach fünfminütiger Inkubation wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Oberfläche gelöst, in ein eiskaltes 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und für 10 s gevortext. Nach 30 minütiger Inkubation bei 4°C über Kopf geschüttelt und die Zelllysate bei 4°C für 2 min, 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues eiskaltes Eppendorfgefäß überführt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe 1.2.3.2) wurden die Proben mit 6 x Proteinladepuffer versetzt. Dieser wurde auf 1 x Proteinladepuffer in der Probe verdünnt. Abschließend wurden die Proteinlysate zur Denaturierung für 5 min bei 95° C erhitzt und bei -20° C bis zum weiteren Gebrauch weggefroren.

2.2.3.1.2 *Herstellung von Proteinextrakten aus neuronalem Gewebe der Maus*

Zuerst wurde das zu untersuchende Gewebe herauspräpariert und möglichst ohne Flüssigkeit in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert, welches umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren wurde und anschließend bis zur Herstellung der Proteinlysate bei -80 °C gelagert wurde.

Nach Zugabe von 200 µl Lysispuffer/ Probe wurde das Gewebe mittels einer 22-gauge Injektionsnadel durch mehrfaches Hoch- und Herunterziehen der Spritze homogenisiert. Das Lysat wurde anschließend für 5 Minuten auf Eis inkubiert, gevortext und für 30 Minuten bei 4°C über Kopf geschüttelt. Die weiteren Protokollschritte erfolgten wie unter 2.2.3.1.1 beschrieben.

2.2.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden in eine Plastikkuvette 795 µl PBS mit 5 µl des in 2.2.3.1.1 und 2.2.3.1.2 hergestellten Proteinextraktes und 200 µl Bradford-Reagenz vermischt. Als Leerwert wurde anstelle des Proteinextraktes 5 µl Proteinlysepuffer verwendet. Die Proben wurden 5 min bei RT inkubiert. Es folgte die Messung der Extinktion am Photometer bei 595 nm. Anhand einer Eichgeraden, die aus bekannten BSA Konzentrationen ermittelt wurde, konnte die jeweilige Proteinkonzentration bestimmt werden.

2.2.3.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE erfolgt die Auftrennung der Proteine nach dem Molekulargewicht. Hierzu wurden für jede Probe 10 µg Protein in die Tasche eines 4% Sammelgels geladen. Als Standard zur Molekulargewichtsbestimmung wurden 5 µl des vorgefärbten Größenmarkers von Fermentas mitgeführt. Die Gelelektrophorese erfolgte im SDS-Elektrophoresepuffer in einem 10% Trenngel für 15 min bei 90 V und anschließend 90 min bei 150 V.

2.2.3.4 Western Blot

Beim Western Blot wurden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen und durch proteinspezifische Antikörper detektiert. Der Transfer erfolgte nach dem Nass-Blot Verfahren in der Blotting-Apparatur von Bio-Rad, wobei das SDS-Gel und die Membran nach dem „Sandwich“-Prinzip angeordnet wurden. Dazu wurde das Gel aus der Elektrophoreseapparatur entnommen, das Sammelgel entfernt und für 15 s in Methanol anschließend in 1 x Transferpuffer äquilibriert. Ebenso wurden die Schwämme, das Whatman-Papier und die Membran in 1 x Transferpuffer getränkt. Der Aufbau des Sandwiches erfolgte luftblasenfrei von der Kathode (Minuspol) zur Anode (Pluspol): Schwamm, Whatman-Papier, Gel, Membran, Whatman-Papier, Schwamm. Das Sandwich wurde geschlossen und in die Blotting-Apparatur überführt und diese mit eiskaltem 1 x

Transferpuffer aufgefüllt. Der Transfer erfolgte für 1h bei 100V unter Kühlung mittels einer Bio-Eis Kühleinheit.

Um die Transfereffizienz ungefähr abschätzen zu können, wurden die Proteine in der Membran mit einer Ponceau-S-Färbung sichtbar gemacht. Eine Entfärbung wurde durch TBST erreicht. Anschließend wurde die Membran zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen 30 min bei RT in Blockierungslösung inkubiert. Im Folgenden wurde die Membran kurz mit 1 x TBST gewaschen und über Nacht bei 4°C mit dem entsprechenden Primärantikörper in Blockierungspuffer inkubiert. Die Membran wurde dann 3 x 15 min in TBST gewaschen und für 1h mit dem entsprechenden Sekundärantikörper bei RT inkubiert. An den Sekundärantikörper ist kovalent Meerrettich-Peroxidase gebunden, welche für die spätere Detektion notwendig ist. Anschließend wurde die Membran 1 x 15 min und 3 x 5 min in TBST gewaschen und zuletzt für 1 min mit ECL inkubiert. Die Peroxidase oxidiert das in der Lösung vorhandene Luminol, was zu einer Chemilumineszenzreaktion führt. Die Membran wurde in einer Photokassette platziert und die durch Luminol verursachte Chemilumineszenz durch Exposition der Membran auf einem Röntgenfilm detektiert.

2.2.4 Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen und Statistik

Mikroskopische Aufnahmen wurden entweder mit einem Zeiss Axiovert 200M oder Zeiss LSM *confocal* angefertigt unter der Verwendung einer AxioCam Kamera und Axiovision Software. Es wurden 10 x, 20 x, 63 x, 100 x Objektive benutzt mit einer numerischen Apertur von 0.3, 0.8 bzw. 1.3 (Öl). Die Bilder wurden gegebenenfalls mittels Photoshop Software (Adobe) weiter bearbeitet.

Für die Analyse der Wachstumskegelmorphologie (**Abb. 3.7**) wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt. In jedem Experiment wurden 20 Neurone/Bedingung analysiert. Mit Hilfe der Axiovision Software wurden die Filopodienanzahl und Filopodienlänge (nur Filopodien mit einer Länge von $> 1 \mu\text{m}$ wurden berücksichtigt), sowie die Gesamtfläche des Wachstumskegels für alle Wachstumskegel/ Neuron bestimmt. Für die Quantifizierung der Neuritenanzahl

und deren Verzweigungen wurden nur Neuriten ausgewertet, die länger als 30 μm waren und Verzweigungen mit einer Länge von mindestens 2 μm aufwiesen.

Für organotypische Schnittkulturen wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Hierbei wurden pro Experiment die hippocampalen Schnitte von 5 Mäusen verwendet. Für jede Bedingung konnten so mindestens 30 Schnitte ausgewertet werden. Um die ektopischen Verzweigungen des Moosfaserbündels in die CA3 Region des Hippocampus zu messen, wurde die Anzahl von Dil-positiven Pixel in einem definierten Bereich der CA3-Region mittels der Axiovision Software bestimmt.

Um die Translokation der MAP-Kinase ERK zu ermitteln (**Abb. 3.16**), wurde mit Hilfe der Axiovision Software das Verhältnis von zytoplasmatischer zu nukleärer ERK-Intensität bestimmt. Vier unabhängige Experimente wurden durchgeführt, wobei 25 Neurone/ Bedingung/ Experiment analysiert wurden.

Bei proteinbiochemischen Analysen (**Abb. 3.14** und **Abb. 3.15**) wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt und die Ergebnisse mit Hilfe der Image Quant Software (Molecular Dynamics) ausgewertet.

Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde der *student's t-test* angewendet mit *, **, *** für $P \leq 0.05, 0.01, 0.001$. Die Standardabweichungen wurden durch den Fehlerbalken dargestellt.

3 Resultate

3.1 Untersuchung neuer Faktoren für die axonale Lenkung im Hippocampus der Maus

3.1.1 Untersuchung neuer Faktoren für die axonale Lenkung auf Genexpressionsebene

Als ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor übernimmt SRF eine Vielzahl wichtiger Funktionen im Säugetierorganismus, so auch in der Entwicklung des Nervensystems (Knoll and Nordheim, 2009). Eine vorderhirn- und neuronenspezifische konditionale Deletion von *Srf* führt u.a. zu schweren Fehlleitungen axonaler Moosfaserbündel im Hippocampus (ausführliche Erläuterung und Beschreibung des Mausmodells siehe 1.2.4.2) (Knoll et al., 2006). Ursache dessen können u.a. auf axonaler Seite (z.B. fehlerhafte Rezeptorexpression) oder in der Umgebung (z.B. veränderte Expression und Verteilung von Zelladhäsions- oder Lenkungsmolekülen) liegen. Ein Ziel dieser Arbeit ist es, neue Faktoren herauszufinden, die durch *Srf*-Deletion direkt oder indirekt beeinflusst werden, um somit den Prozess der fehlerhaften Moosfaserwegfindung in *Srf*-Mutanten besser verstehen zu können.

Ein Möglichkeit zur Analyse von SRF-Zielgenen bietet die microArray *GeneChip* Technologie. Hierbei wurde im Labor der AG Knöll bereits RNA von Wildtyp- und SRF-defizientem Gewebe isoliert und mittels *GeneChip* Analysen beide Gewebe verglichen. Dadurch konnten in Kontrolltieren und Mutanten genomweit unterschiedlich exprimierte SRF-Zielgene identifiziert werden (Stritt et al., 2009). Hierbei kamen u.a. vier Faktoren in Betracht, welche potentiell in dem Vorgang der axonalen Lenkung involviert sein können. Dies sind zum einen P-Selectin, C4, Ccl12 und Glycam1. Obwohl diese Moleküle nicht in erster Linie mit dem Gehirn assoziiert werden, ist die Expression aller Faktoren vor allem im Hippocampus sehr hoch (www.brain-map.org).

P-Selectin (*platelet Selectin*) stellt ursprünglich ein Zelladhäsionsmolekül auf der Oberfläche aktivierter Endothelzellen dar und spielt eine wichtige Rolle in der

Rekrutierung von Leukozyten (Tedder et al., 1995). Im zentralen Nervensystem wurde es mit experimenteller autoimmun Encephalomyelitis (EAE), dem Mausmodell für Multiple Sklerose, in Verbindung gebracht (Engelhardt, 2008). In den Affymetrix *GeneChip* Daten war dieses Molekül in *knock-out* Mäusen um den Faktor 2,4 herunterreguliert, verglichen mit Kontrollmäusen.

C4 (*complement C4*) gehört zur Gruppe der Chemokine, welche hauptsächlich als Chemoattraktant für andere Zellen (vornehmlich des Immunsystems) agieren (Rossi and Zlotnik, 2000). Zudem wurde es als Mitglied der Komplementkaskade mit der Eliminierung von Synapsen während der Gehirnentwicklung in Verbindung gebracht (Schafer and Stevens, 2010). Dieses Molekül war in SRF-defizientem Gewebe um den Faktor 5,5 hochreguliert.

Der dritte Faktor Ccl12 (Chemokin (C-C Motiv) Ligand 12) ist, wie der Name besagt, ebenfalls ein Chemokin. Es ist in chemotaktischen Prozessen und in der Immun- sowie inflammatorischen Antwort involviert (Allen et al., 2007). *GeneChips* Daten zeigten eine 3,4-fache Hochregulierung in Gewebe aus SRF-defizienten Tieren gegenüber Kontrolltieren.

Der vierte Faktor, Glycam1 (*glycosylation dependent cell adhesion molecule 1*), stellt ebenso wie P-Selectin ein Zelladhäsionsmolekül dar und wird primär von HEV-Zellen (*high endothelial venules*) im Lymphknoten exprimiert. Durch Bindung an L-Selectin ist Glycam1 maßgeblich an der Leukozytenbindung beteiligt (Rosen et al., 1997). Dieses Molekül ist in *Srf*-Mutanten um den Faktor 4,5 hochreguliert.

Zur Verifizierung der *GeneChip* Daten wurden Hippocampi von Wildtyp- und *Srf*-deletierten Mäusen aus drei postnatalen Stadien (P2, P6 und P14) isoliert und die relative mRNA Menge mittels quantitativer RT-PCR bestimmt (**Abb. 3.1**). Da in den Hippocampi konditionaler *knock-out* Mäuse die *Srf*-Menge gegenüber Kontrolltieren herunterreguliert sein soll, wurde zur Überprüfung dieses Sachverhaltes auch die mRNA Menge von *Srf* bestimmt (**Abb. 3.1A**). Hier ist deutlich zu erkennen, dass zu allen Entwicklungszeitpunkten die *Srf*-Menge in Wildtyp-Mäusen (durchgehend schwarze Linie) höher ist als in den Mausmutanten (gestrichelte Linie). Besonders deutlich wird dieser Effekt bei 14 Tage alten Mäusen (P14). Dieser graduelle Prozess der Abnahme ist mit der in späten embryonalen Entwicklungsstadien einsetzenden Aktivität der CamKII α zu erklären. Hierbei ist bei der Geburt der Mausmutanten noch

endogenes SRF vorhanden, welches mit zunehmender Dauer der CamKII α -Aktivität dann jedoch abnimmt (ausführliche Erklärung des Mausmodells siehe 1.2.4.2).

Die relative mRNA Menge von *Selp* (P-Selectin) ist in frühen postnatalen Entwicklungsstadien (P2, P6) bei *Srf*^(+/+)- und *Srf*^(-/-)- Mäusen gleich (Abb 3.1B). Jedoch ist bei P14 alten *knock-out* Mäusen ein robuster Abfall um Faktor 2,5 gegenüber den Kontrolltieren zu vermerken, was die *GeneChip* Daten bestätigt. Die mRNA Menge von *C4* bereits 6 Tage nach Geburt der Mäuse einen Unterschied zwischen Wildtyptieren und Mutanten (Abb 3.1C). Bei P14 ist der Effekt am ausgeprägtesten. In *Srf*-deletiertem Gewebe wird etwa 4 mal mehr mRNA exprimiert. Ähnlich wie bei *Selp* verhält sich auch die Veränderung der Genexpression von *Ccl12* (Abb.3.1D). Erst in P14 alten Hippocampi ist eine Unterschied zwischen den beiden Gruppen erkennbar. Hierbei erfolgt etwa eine 2-fache Hochregulierung des Gens in SRF-defizientem Gewebe. Das letzte zu überprüfende Molekül war *Glycam1*. Auch hier erfolgt bei P14 ein robuster Anstieg der relativen *Glycam1*-Menge in Mausmutanten, jedoch nicht in Kontrolltieren.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die *GeneChip* Daten mittels qRT-PCR bestätigt werden konnten.

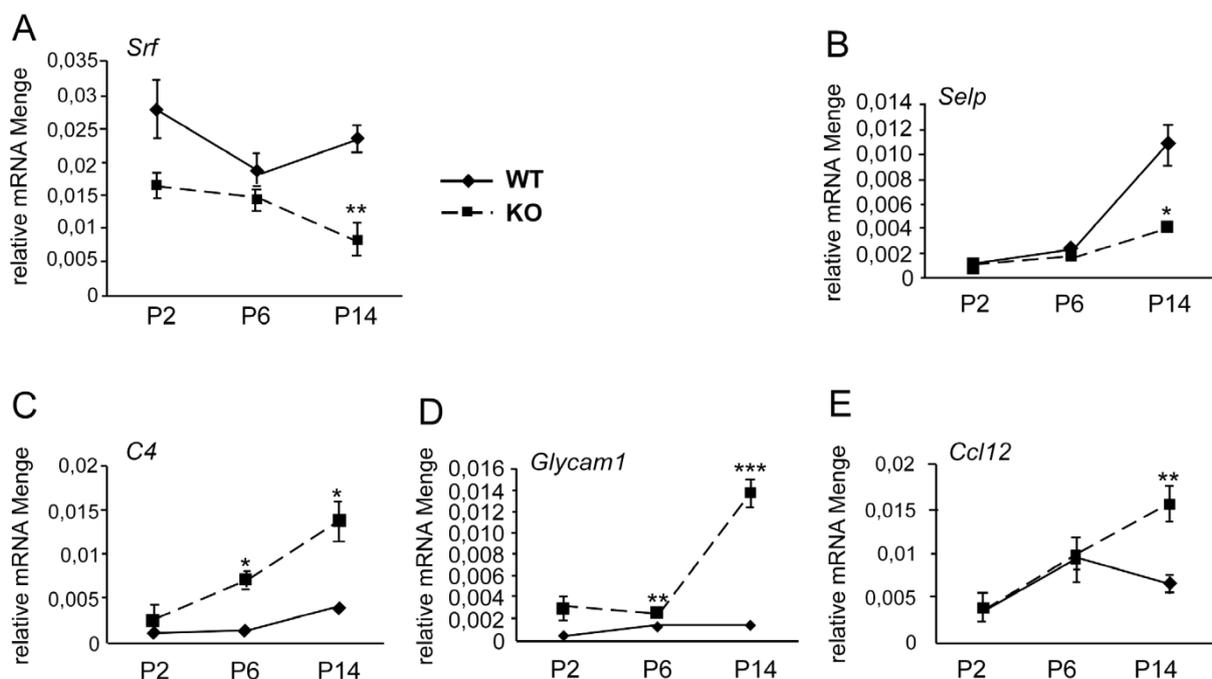


Abb.3.1. Unterschiedliche Genexpression von SRF-Zielgenen in Wildtyp und *Srf*-deletiertem Gewebe.

Hippocampi von P2, P6 und P14 alten Wildtyp (durchgängig schwarze Linie) und *Srf*-deletierten Mäusen (gestrichelte Linie) wurden isoliert und anschließend die relative Menge der indizierten Gene mittels qRT-PCR bestimmt. Als Kontrolle dienten Primer für das Haushaltsgen *Gapdh*. Anzahl der Tiere n = 5

(A) In SRF-defizientem Gewebe ist die relative *Srf* mRNA Menge 2-3-fach reduziert gegenüber Wildtyp-Gewebe. Der Effekt ist am stärksten in P14 alten Mäusen.

(B) Die Expression von P-Selectin (*Selp*) ist im Hippocampus von SRF-defizienten P14 Mäusen 3-fach höher gegenüber Wildtyp-Gewebe.

(C-E) Die relative Menge der mRNA der Chemokine *C4* und *Ccl12* (C, E) und des Zelladhäsionsmoleküls *Glycam1* (D) ist im hippocampalen Gewebe von *Srf*^{-/-} - Mäusen etwa 3-fach erhöht. Der Effekt ist am prominentesten bei 14 Tage alten Mäusen.

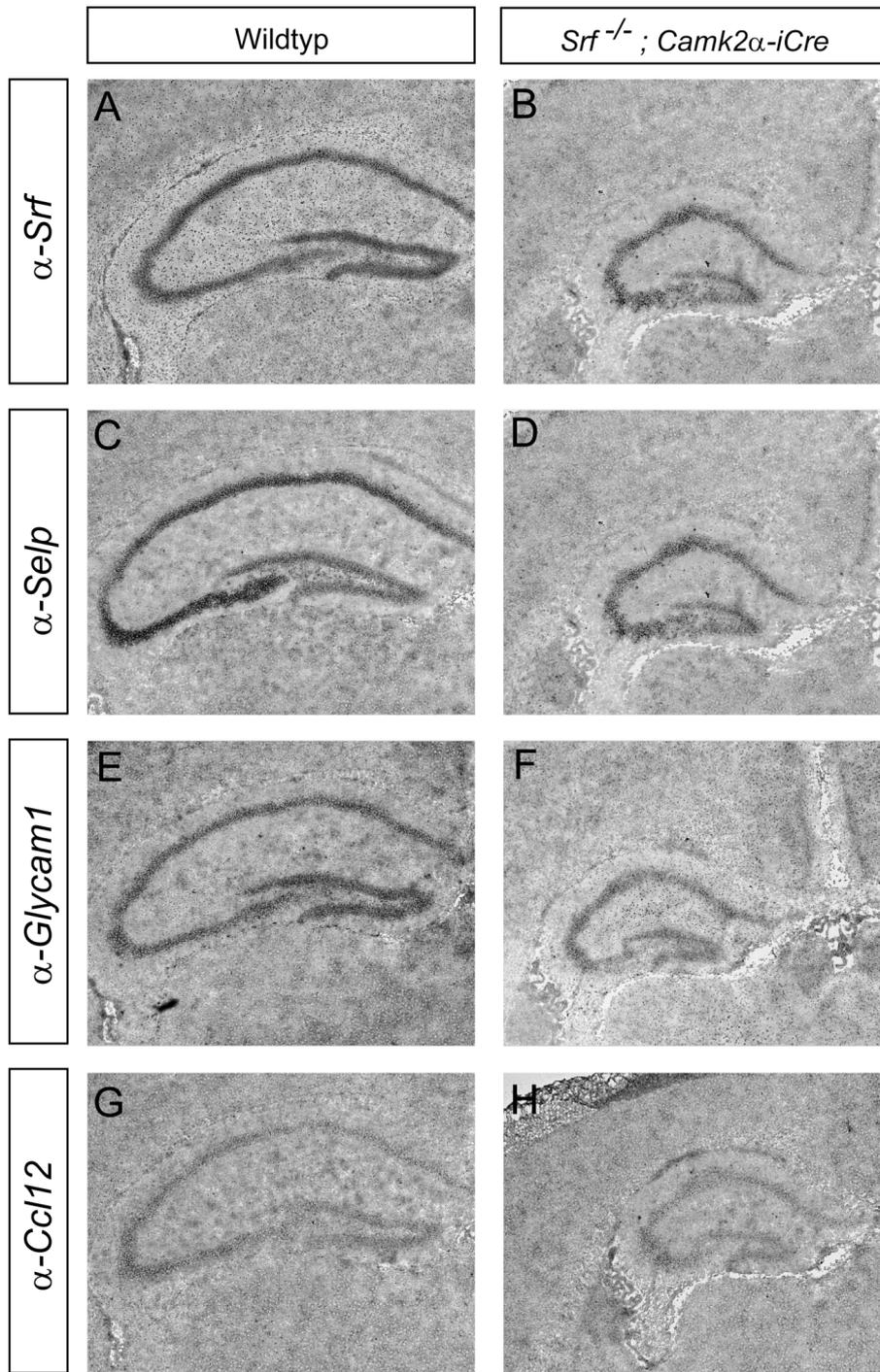
*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

3.1.2 Lokalisierung der Genexpression neuer Faktoren im Hippocampus

Im vorangegangenen Experiment (Abb. 3.1) konnte gezeigt werden, dass Zelladhäsionsmoleküle und Chemokine in wildtypischem und SRF-defizientem Gewebe unterschiedlich stark exprimiert werden, was als Ursache für das fehlerhafte hippocampale Moosfaserwachstum in *Srf*-Mutanten in Betracht gezogen werden kann. Um nun eine mögliche Beteiligung von *Selp*, *C4*, *Glycam1* und *Ccl12* in diesem Prozess weiter zu untersuchen, wurde im Folgenden mittels in-situ-Hybridisierung bestimmt, in welchen Teilen des Hippocampus die unterschiedlichen Gene exprimiert werden (Abb. 3.2). Da der stärkste Unterschied zwischen Wildtyp und *Srf*-Mutanten in der relativen mRNA Expressionsmenge bei allen untersuchten Genen zum Zeitpunkt P14 lag (Abb. 3.1), wurden für dieses Experiment die Hippocampi von P14 alten Mäusen verwendet.

Wie erwartet, ist die Expression von *Srf* in Mutanten (Abb. 3.2B) wesentlich schwächer als in Wildtyp-Mäusen (Abb. 3.2A), was die Daten im zuvor durchgeführten Experiment unterstützt (Abb. 3.1A). Der Vergleich zwischen der Expressionsmenge von *Selp* im Wildtyp und der *Srf*-Mutante zeigt, dass auch hier, wie in Abb. 3.1, die Expressionsmenge in SRF-defizienten Hippocampi wesentlich geringer ist als im Wildtyp (Abb. 3.2C, D), wobei in beiden Fällen das stärkste *Selp*-Signal in der Zellkörperschicht der CA-Region und weniger im Gyrus dentatus lokalisiert ist (Abb. 3.2.c). Die Expression des Zelladhäsionsmoleküls *Glycam1* ist sowohl in der Zellkörperschicht der CA-Region als auch im Gyrus dentatus lokalisiert, wobei hier der zu erwartende Anstieg in SRF-defizienten Mäusen (Vergleich Abb. 3.1D) nicht zu

verzeichnen ist (**Abb. 3.2E, F**). Hierfür kommt eine unspezifische Bindung der in-situ-Hybridisierungssonde in Betracht. Ähnliches gilt für das Chemokin *Ccl12*. Ein Unterschied in der Expression zwischen wildtypischen (**Abb. 3.2G**) und SRF-defizientem Gewebe (**Abb. 3.2H**) ist im Hippocampus nicht zu verzeichnen. Das stärkste Expressionssignal ist in beiden Geweben in der CA3-Zellkörperregion lokalisiert (**Abb. 3.2G, H**). Die EphA6-Rezeptoren zeigten in *GeneChips* zwar keine Veränderung, stellen jedoch ebenso wichtige Regulatoren der axonalen Wegfindung dar (siehe Einleitung 1.1.2.1). Wie vermutet ist kein Unterschied zwischen Wildtyp und *Srf*-Mutanten zu verzeichnen (**Abb. 3.1I, J**). In beiden Geweben wird der EphA6-Rezeptor stark im *Str. pyramidale* der CA-Region exprimiert, jedoch nicht im Gyrus dentatus. Ein sehr interessantes Expressionsmuster ergibt sich bei dem Chemokin C4 (**Abb. 3.2K- N**). mRNA Expressionsstudien zeigte eine 4-fach erhöhte Expression des Genes in *Srf*-Mutanten verglichen mit Kontrolltieren (siehe **Abb. 3.1B**). Hierbei ist auffällig, dass in Wildtyp Mäusen eine uniforme Expression in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus sowie in der CA-Region des *Str. pyramidale* zu verzeichnen ist (**Abb. 3.2K**). In *Srf*-Mutanten hingegen ist in diesen Bereichen keine Expression zu erkennen, jedoch eine starke punktuelle Lokalisierung im Bereich der Ventrikel (**Abb. 3.2L, Vergrößerung in N**), was auf einen Entzündungsprozess hinweisen könnte. Die beschriebene punktuelle Expression bleibt bei Kontrolltieren aus (**Abb. 3.2K, Vergrößerung in M**).



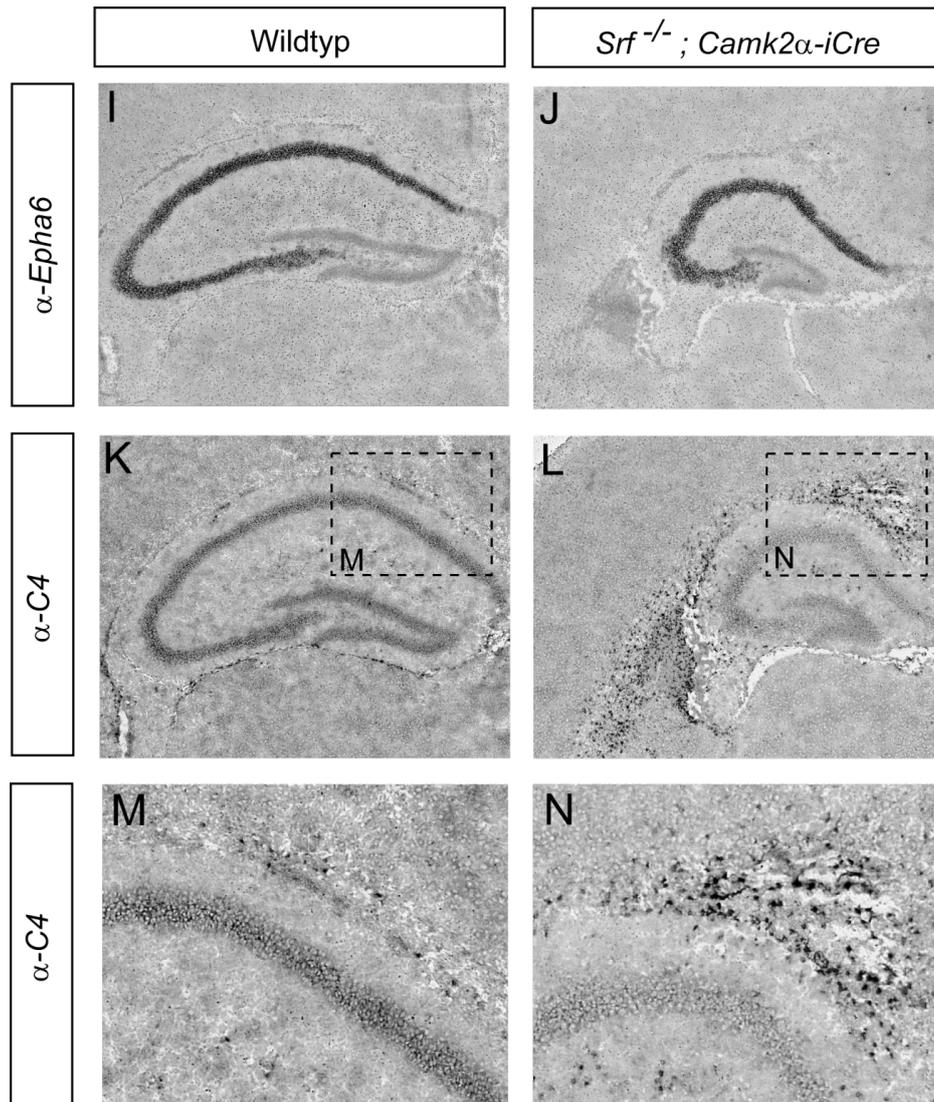


Abb. 3.2. Lokalisierung der Genexpression in die Moosfaserwegfindung potentiell involvierter Moleküle mittels *in-situ*-Hybridisierung.

Hippocampale Kryostatschnitte wurden von P12 SRF-WT und SRF-defizienten Mäusen angefertigt und mit der entsprechenden RNA- Sonde hybridisiert. Entsprechende sense-Hybridisierungssonden erzeugten kein Signal (Daten nicht gezeigt).

(A, B) *Srf* ist wie erwartet im Wildtyp (A) stärker exprimiert als in *Srf*-Mutanten (B).

(C, D) Das *Selp*-Signal ist in der CA-Zellkörperregion am stärksten, wobei die Expression in Mutanten (D) schwächer ist als in Kontrolltieren (C).

(E, F) *Glycam1* ist in Kontrolltieren (E) in der CA-Zellkörperregion und dem Gyrus dentatus (DG) exprimiert. Die Gesamtexpressionsmenge in Mutanten (F) ist deutlich geringer als in Wildtyp-Mäusen.

(G, H) *Ccl12* ist sowohl in Kontrolltieren (G) als auch in Mausmutanten (H) gering exprimiert, wobei das stärkste Signal innerhalb der CA3-Region der Zellkörperschicht liegt.

(I, J) *Epha6* wird sowohl in wildtypischem (I) wie auch in SRF-defizientem (J) Gewebe in der CA-Region stark exprimiert.

(K- N) Das Chemokin C4 zeigt in Wildtypmäusen eine gleichmäßiges Signal in der Zellkörperschicht des DG wie auch in der CA-Region (K, Vergrößerung in M). In Mausmutanten ist kein Signal in den hippocampalen Schichten erkennbar, jedoch ein stark punktförmiges Signal in den Ventrikeln (L, Vergrößerung in N).

3.1.3 Untersuchung der hippocampalen Moosfaserwegfindung in *Srf*-defizienten Mäusen

Die Generierung einer konditionalen *Srf*-Mausmutante (Näheres siehe 1.2.4.1) offenbarte einen spezifischen Phänotyp, bei dem die Moosfaseraxone der Körnerzellen des Gyrus dentatus nicht wie bei Kontrolltieren stringent im *Stratum lucidum* verlaufen und Verknüpfungen mit den Dendriten der CA3-Pyramidenzellen ausbilden, sondern innerhalb der CA-Zellkörperregion (*Stratum pyramidale*) verlaufen und Kontakte mit den Pyramidenzellsomata knüpfen (Schematische Darstellung siehe **Abb. 3.3**, oder 1.2.4.1 für ausführlichere Beschreibung).

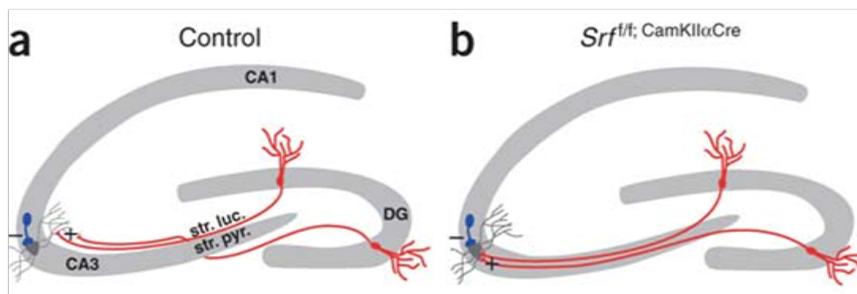


Abb. 3.3. Fehlleitung hippocampaler Moosfasern SRF-defizienter Mäuse.

Rot dargestellt sind die Moosfaserbündel, blau kennzeichnet die Zellkörper der Pyramidenzellen, grau deren Dendriten. Im Wildtyp verlaufen die Moosfaseraxone im *Str. lucidum* und treten nicht in die Zellkörperschicht ein, sondern bilden Synapsen mit den Dendriten der CA3-Pyramidenzellen. In *Srf*-Mutanten werden die Moosfaserbündel innerhalb der CA-Zellkörperschicht fehlgeleitet und bilden Synapsen mit den Somata der Pyramidenzellen aus. CA = *Cornu ammonis*, DG = Gyrus dentatus, str. pyr. = *Stratum pyramidale* (Zellkörperschicht), str. luc. = *Stratum lucidum* (dendritenreiche Schicht) nach (Knöll et al., 2006)

Bisher vorangegangene Experimente haben Zelladhäsionsmolekülen und Chemokinen eine mögliche Funktion in dieser Phänotypausbildung zugeschrieben. Zur weiteren Untersuchung dieser hippocampalen Moosfaserfehlleitung in SRF-defizienten Mäusen wurde die organotypische Schnittkultur nach der Interface-Methode (Stoppini et al., 1991) in dem Labor der AG Knöll, Universität Tübingen, etabliert um das Moosfaserwachstum unter *in-vivo* nahen Bedingungen beobachten zu können. Hierfür wurden transversale Schnitte des Hippocampus angefertigt (siehe 2.2.1.6.1) und der Moosfasertrakt mittels des lipophilen Markierungstoffes Dil

angefärbt, wobei das Hauptaugenmerk auf dem oberhalb der Zellköperschicht verlaufenden suprapyramidalen Ast liegt (siehe 2.2.1.6.2 und Übersichtsbild **Abb. 3.4**). Der von Knöll et al. entdeckte Phänotyp wurde für P14 Mäuse beschrieben. Zur Etablierung des organotypischen Schnittkultursystems wurde in einem ersten Schritt hippocampale Schnittkulturen von P14 alten Kontrolltieren und *Srf*-Mutanten angefertigt (**Abb. 3.5**). Hierbei ist gut zu erkennen, dass in Wildtyp-Tieren (**Abb. 3.5A- C**) der suprapyramidale Trakt (gekennzeichnet durch Pfeilspitze) innerhalb des *Stratum lucidum* verläuft und das *Stratum pyramidale* ausspart. Auch die durch DAPI angefärbte CA- Zellköperschicht verläuft wie erwartet in einem kompakten Band (**Abb. 3.5B**). Hingegen ist in *Srf*-Mutanten (**Abb. 3.5D- F**) zu beobachten, dass das suprapyramidale Bündel weniger kompakt ist, sondern eher defaszikulierte und innerhalb des *Stratum pyramidale* verläuft (**Abb. 3.5D, F**). Auch die CA-Zellköperschicht scheint wenig kompakt. Vielmehr scheinen die Somata der Pyramidalzellen dispers angeordnet, was ein möglicher Grund für die Fehlleitung der Moosfasern sein könnte (Ausführlicheres siehe Diskussion 4.2).

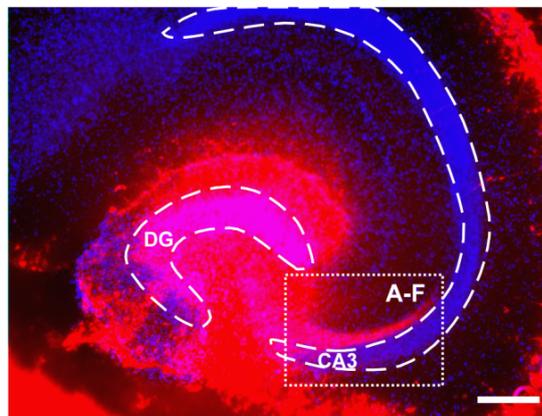


Abb. 3.4. Übersichtsbild eines angefertigten hippocampalen Schnittes.

Eine hippocampale Schnittkultur wurde angefertigt und die Moosfasertrakte mittels des lipophilen Farbstoffes Dil angefärbt (rot). Die Zellkörper wurden mit DAPI angefärbt und sind mit blau dargestellt. Innerhalb des gestrichelten Kästchens ist der suprapyramidale Trakt zu sehen. Dieser verläuft oberhalb der CA3-Zellköperschicht. In **Abb. 3.5** und **Abb. 3.6** zeigen die Bilder (A- F) diesen Ausschnitt.

DG = Gyrus dentatus, CA3 = *cornu ammonis* (Körnerzellschicht).

Maßstab (B) = 200 µm

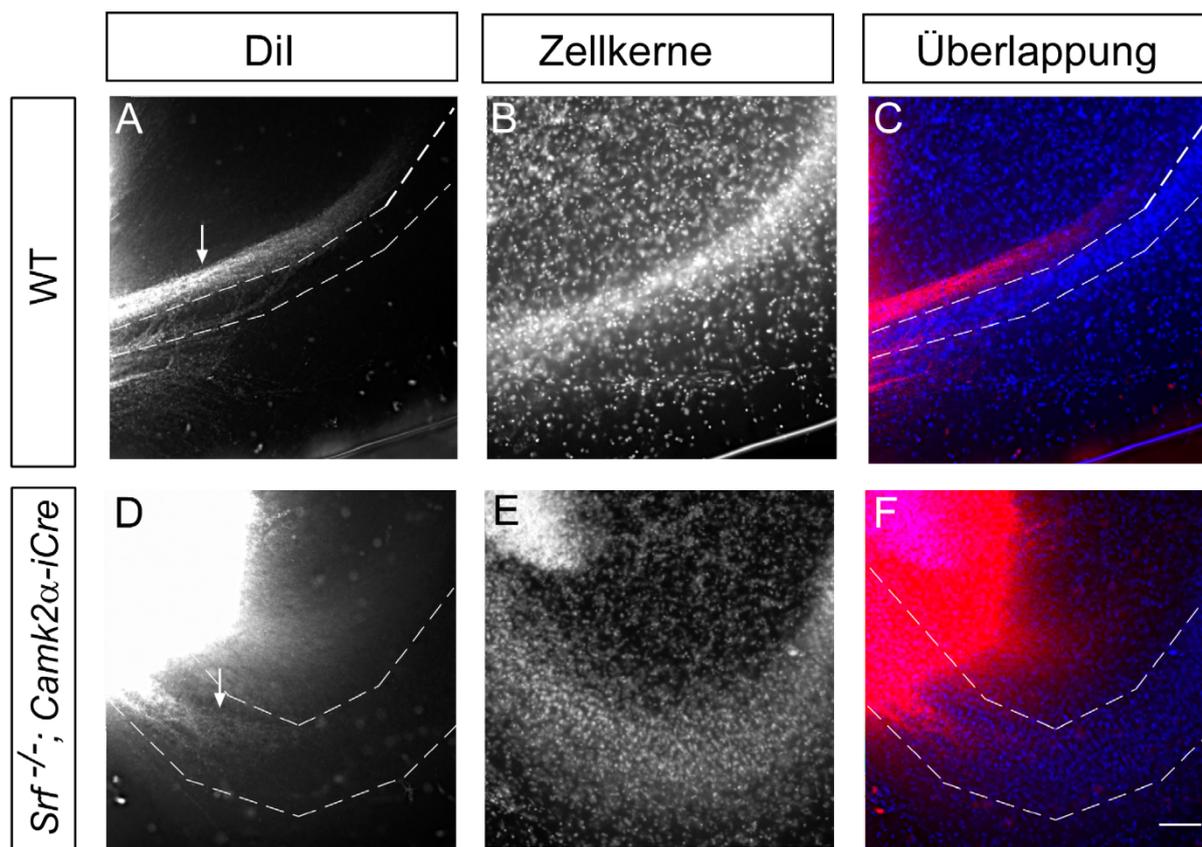


Abb. 3.5. Hippocampale Moosfaserfehlleitung in spät-postnatalen SRF-defizienten Mäusen.

Hippocampalen Schnittkulturen von P11 Wildtyp und Mausmutanten wurden angefertigt, 3 div kultiviert und mit dem Markierungsstoff Dil (rot) die Moosfasern angefärbt. Die Pfeilspitze markiert den suprapyramidalen Ast. Blau gefärbt mittels DAPI sind die Zellkörper

(A- C) Moosfasern im Wildtyp verlaufen stringent im *Str. lucidum*. Die CA-Zellkörperregion ist kompakt.

(D- F) Moosfasern in *Srf*-Mausmutanten verlaufen innerhalb des *Str. pyramidale*. Die Zellkörperregion ist dispers und nicht kompakt wie in Kontrolltieren.

Maßstab = 50 µm

Da es sich möglicherweise um einen Migrationsdefekt hippocampaler Pyramidenzellen handelt, werden im Folgenden organotypische Schnittkulturen früherer Entwicklungsstadien durchgeführt, da es besonders in den ersten postnatalen Tagen zu einem starken Entwicklungs- und Differenzierungsprozess des Hippocampus kommt (siehe Einleitung 1.1.4.3 und 1.1.4.4). Hierfür wurden hippocampale Schnittkulturen von P2 Wildtyp und *Srf*-Mutanten angefertigt, Moosfasern mit Dil (rot) markiert und Zellkörper nach 1 div mit DAPI gefärbt (Abb. 3.6). Hierbei ist in wildtypischen Schnittkulturen eine erste Ausdifferenzierung des supra- und infrapyramidalen Bündels zu beobachten, welche die Zellkörperschicht nicht penetrieren (Abb. 3.6. A, Moosfaserbündel gekennzeichnet durch Pfeilspitzen).

Die Zellkörperschicht des DG sowie die CA-Zellkörperregion hat sich bereits in einer kompakten Schicht formiert (Abb. 3.6B), wenn diese auch noch nicht so ausgeprägt ist wie in älteren Tieren (Vergleich Abb. 3.5). Schon in frühen Entwicklungsstadien SRFdefizienter Mäuse scheint die Ausbildung einer kompakten CA-Zellkörperschicht gestört (Abb. 3.6D), da diese verglichen mit Kontrolltieren wesentlich diffuser erscheint. Eine Aussage über die Moosfaserwegfindung ist nur schwer zu treffen, da in SRF-defizienten hippocampalen Schnitten Moosfaserbündel weitaus schlechter anzufärben waren. Dieser Fakt kann jedoch auch bedeuten, dass die Ausbildung in frühen postnatalen Stadien in *Srf*-Mutanten gegenüber den Kontrolltieren verspätet verläuft, was dazu führt das weniger Fasern markiert werden können.

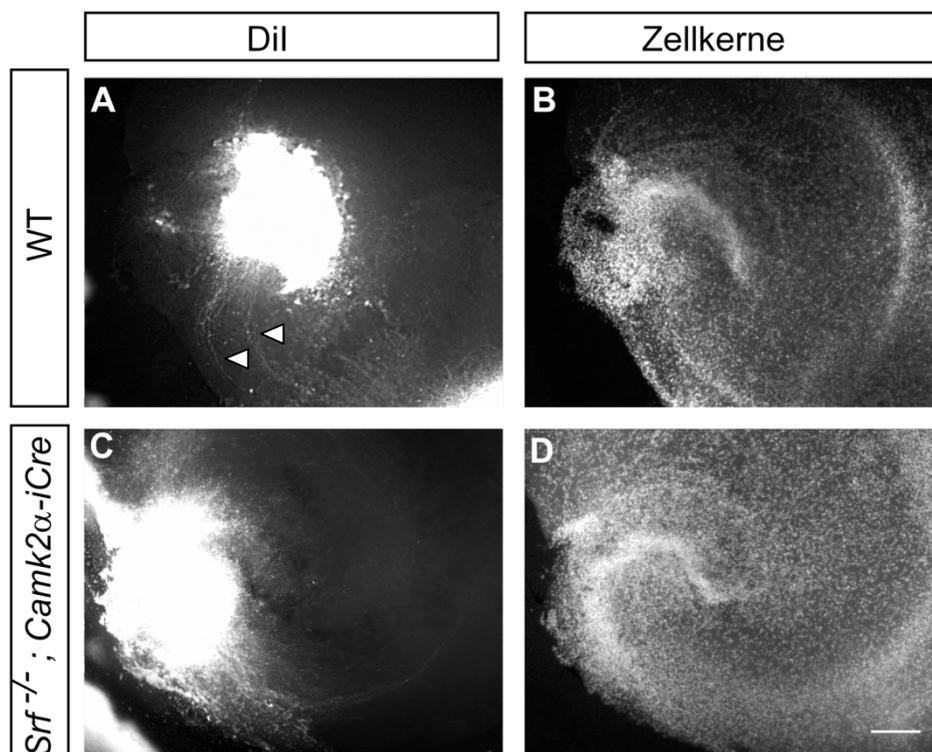


Abb. 3.6. Moosfaserfehlleitung in früh-postnatalen SRF-defizienten Mäusen.

Hippocampalen Schnittkulturen von P2 Wildtyp und Mausmutanten wurden angefertigt, 1 div kultiviert und mit dem Markierungsstoff Dil die Moosfasern angefärbt. Zellkörper wurden mittels DAPI angefärbt.

(A, B) Moosfasern im Wildtyp spalten sich bereits in einen oberen und unteren Ast auf. Die CA-Zellkörperregion ist kompakt.

(C,D) Moosfasern in Mausmutanten verlaufen innerhalb des *Str. pyramidale*. Die CA- Zellkörperregion ist dispers und nicht kompakt wie in Kontrolltieren.

Maßstab = 200 µm

3.2 Interaktion der EphA- und Neurotrophin-Signaltransduktion in der axonalen Wegfindung

3.2.1 Die vorwärts gerichtete EphA-Signalweiterleitung wirkt *in vitro* der BDNF-induzierten Wachstumskegelmorphologie in Abhängigkeit von SRF entgegen

Für die korrekte Verschaltung neuronaler Netzwerke ist eine präzises Zusammenspiel verschiedener Faktoren, wie z.B. Lenkungsmolekülen, notwendig. Im Fokus dieser Arbeit stehen das vornehmlich repulsiv wirkende Lenkungsmolekül Ephrin-A5 und das eher attraktiv agierende neurotrophe Molekül BDNF, dessen gegensätzliche Wirkungen u.a. für die Ausbildung topographischer Karten des retinotektalen Systems im Hühnchen von elementarer Bedeutung sind (McLaughlin and O'Leary, 2005). Hierbei wird angenommen, dass wachstumsfördernde Faktoren wie z.B. BDNF zu einem initialen Überschießen der retinalen Axone führt und repulsive Faktoren, wie z.B. Ephrin-A5, in einem späteren Entwicklungszeitpunkt die Retraktion der Axone bis hin zu ihrem eigentlichen Zielgebiet bedingt. Auch im hippocampalen System der Moosfaserentwicklung ist dieser Retraktionsprozess zu beobachten (detaillierte Beschreibungen siehe 1.1.4.4), weshalb im Folgenden die Untersuchung hippocampaler Neurone und Axonbündel von großem Interesse ist. Um eine Interaktion zwischen der vorwärts gerichteten EphA-Signaltransduktion und dem BDNF-Signalweg zu untersuchen, wurde das Hauptaugenmerk zuerst auf die Untersuchung der Wachstumskegelmorphologie hippocampaler Primärneurone gelegt. Hierfür wurden die Neurone für 45 min mit den Lenkungsmolekülen Ephrin-A5 und/ oder BDNF stimuliert (**Abb. 3.7**). Wie schon für retinale Ganglienzellen gezeigt (Fitzgerald et al., 2008; Gehler et al., 2004), erhöht BDNF gegenüber der Kontrollsituation (**Abb. 3.7A, B**) die Wachstumskegelfläche (**Abb. 3.7E, F**; siehe Quantifizierung in **Abb. 3.7R**). Die Anzahl der Filopodien nimmt nach BDNF Stimulation ebenso zu (**Abb. 3.7F**, siehe Quantifizierung in **Abb. 3.7Q**). Eine Quantifizierung der durchschnittlichen Filopodienlänge wies zwar keine statistische Signifikanz auf, jedoch ist tendenziell auch hier eine Zunahme zu verzeichnen (siehe Quantifizierung in **Abb. 3.7S**). Nach Applikation mit Ephrin-A5 ist der in der Literatur

ausführlich beschriebene Wachstumskegelkollaps (Knoll et al., 2006; Stern et al., 2009; Yue et al., 2008) deutlich zu erkennen (**Abb. 3.7I, J**). Die durchschnittliche Filopodienanzahl nimmt gegenüber der unstimulierten Situation ab (**Abb. 3.7J**, siehe Quantifizierung in **Abb. 3.7Q**). Ebenso verhält es sich mit der Wachstumskegelfläche. Diese vermindert sich signifikant um etwa die Hälfte gegenüber der Kontrollsituation (siehe Quantifizierung in **Abb. 3.7R**). Ein Effekt auf die Filopodienlänge ist jedoch nicht zu beobachten (siehe Quantifizierung in **Abb. 3.7S**). Wird nun mit beiden Lenkungsmolekülen gleichzeitig stimuliert, ist zu erkennen, dass der auf den Wachstumskegel neurotrophe Effekt von BDNF durch Ephrin-A5 aufgehoben wird (**Abb. 3.7M, N**). Die Wachstumskegel zeigen hier eine eher kollabierte Struktur, wie auch nach alleiniger Stimulation mit Ephrin-A5 (wie **Abb. 3.7I, J**). Kürzlich veröffentlichte ähnliche Ergebnisse für retinale Ganglienzellen unterstützen diese Beobachtung (Fitzgerald et al., 2008; Marler et al., 2008).

Im nächsten Schritt sollte die Fragestellung geklärt werden, ob die Beeinflussung der Wachstumskegelmotilität durch die beiden Lenkungsmoleküle in Abhängigkeit des *Serum Response Factors* geschieht. Hierfür wurden SRF-defiziente hippocampale Primärneurone verwendet. Diese wurden ebenso wie in Wildtypneurone mit BDNF und/ oder Ephrin-A5 stimuliert. In der Kontrollsituation SRF-defizienter Neurone (**Abb. 3.7C, D**) wird der zuvor beschriebene (Knoll et al., 2006; Stern et al., 2009) veränderte Phänotyp gut sichtbar. Hierbei zeigen *Srf*-Mutanten abgerundete Wachstumskegel ohne sichtbare Filopodien (**Abb. 3.7D**). Wildtypneurone weisen gegenüber SRF-defizienten Neuronen eine höhere Anzahl an Neuriten auf, wohingegen *Srf*-Mutanten eher im Durchschnitt zwei Neuriten pro Neuron zeigen. Eine Stimulation mit BDNF (**Abb. 3.7G, H**) führt im Gegensatz zu Wildtypneuronen zu keiner Erhöhung der Wachstumskegelfläche oder Filopodienanzahl. Nach Applikation von Ephrin-A5 ist kein Wachstumskegelkollaps wie bei wildtypischen Neuronen erkennbar (**Abb. 3.7K, L**). Vielmehr weisen die Wachstumskegel ringförmige F-Aktin- und Mikrotubulin-reiche Strukturen auf. Nach Ko-Stimulation mit BDNF und Ephrin-A5 bilden sich ebenso wie bei alleiniger Ephrin-A5 Stimulation (**Abb. 3.7K, L**) ringförmige Strukturen aus (**Abb. 3.7O, P**).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die vorwärts-gerichtete EphA-Signalweiterleitung die BDNF-induzierte Wachstumskegelmorphologie und Neuritenformation/ -verzweigung beeinflusst.

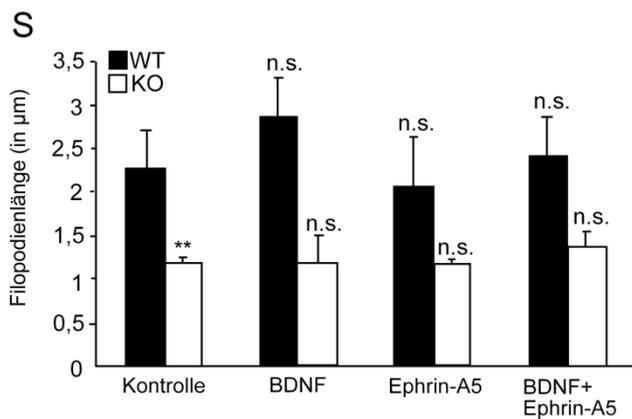
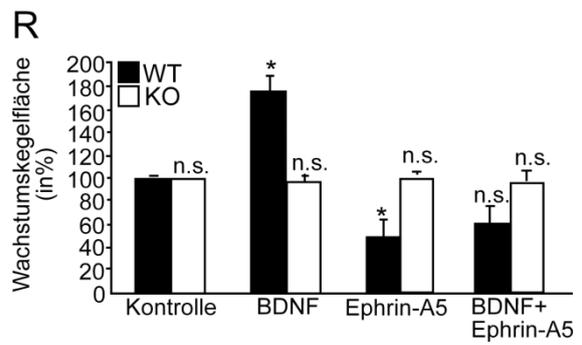
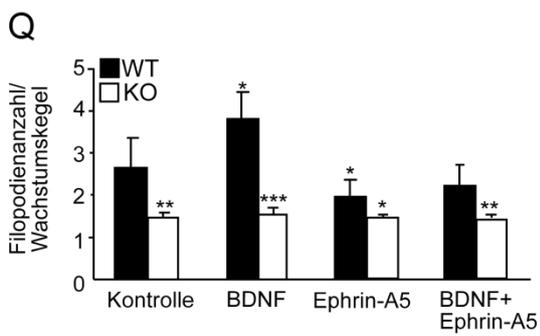
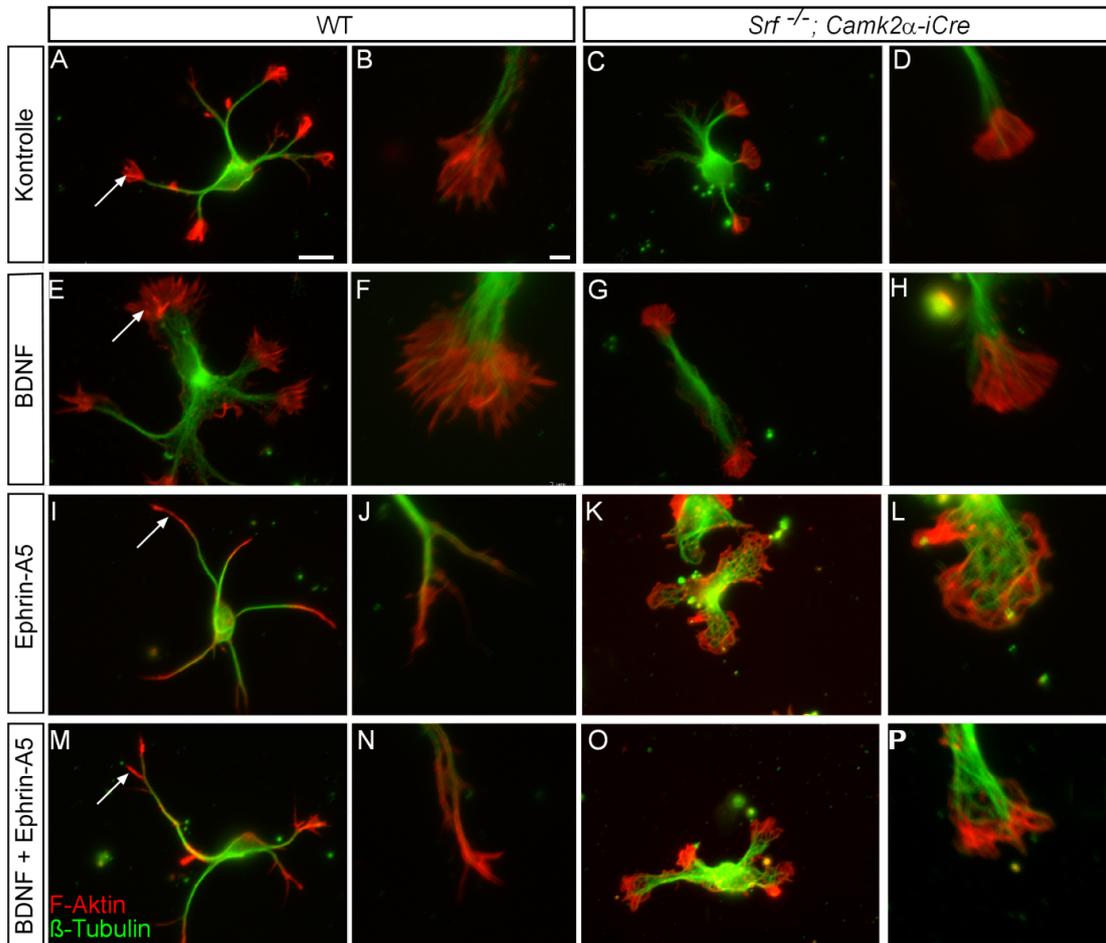


Abb.3.7. Vorwärts gerichtete EphA Signaltransduktion blockiert die BDNF-induzierte Motilität des Wachstumskegels in Abhängigkeit von SRF.

Wildtyp und SRF-defiziente hippocampale Neurone wurden für 45 min mit Ephrin-A5 und/ oder BDNF stimuliert. Anschließend wurde gegen F-Aktin (rot) und Mikrotubuli (grün) gefärbt. Individuelle Wachstumskegel sind mit Pfeilen hervorgehoben.

(A-D) Wildtyp Neurone weisen mehrfache Wachstumskegel mit einer fingerförmigen Filopodienstruktur auf. (A, Vergrößerung in B). *Srf*-Mutanten zeigen abgerundete Wachstumskegel ohne sichtbare Filopodien (C, D).

(E-H) BDNF vergrößert die Wachstumskegelfläche und erhöht die Filopodienanzahl und Filopodienlänge in Wildtyp Neuronen (E, F). SRF-defiziente Neurone zeigen durch die Behandlung mit BDNF keinen Effekt (G, H).

(I-L) Ephrin-A5 Applikation führt zu einem Wachstumskegellaps, vermindert die Filopodienanzahl und die Wachstumskegelfläche (I, J). Ephrin-A5 führt in SRF-defizienten Wachstumskegeln zur Ausbildung von ringförmigen Strukturen (K, L).

(M-P) Ko-Applikation von BDNF und Ephrin-A5 in Wildtyp-Neuronen (M, N) wirkt der BDNF-stimulierten Wachstumskegelmotilität entgegen. Die Wachstumskegel sind eher kollabiert (M, N), als das die Fläche sich vergrößert, so wie bei alleiniger BDNF Applikation (siehe E, F). In SRF-defizienten Neuronen (O, P) entwickelten die Wachstumskegel ringförmige Strukturen wie auch bei alleiniger Ephrin-A5 Stimulation (K, L)

(Q) Quantifizierung der durchschnittlichen Filopodienanzahl/ Wachstumskegel für die verschiedenen Applikationen und Genotypen. Die statistische Signifikanz wurde relativ zur Bedingung Wildtyp/ Kontrolle ermittelt.

(R) Quantifizierung der durchschnittlichen Wachstumskegelfläche (Wildtyp und Kontrollsituation wurden auf 100 % gesetzt).

(S) Quantifizierung der durchschnittlichen Filopodienlänge/ Wachstumskegel für die verschiedenen Applikationen und Genotypen. Die statistische Signifikanz wurde relativ zur Bedingung Wildtyp/ Kontrolle ermittelt.

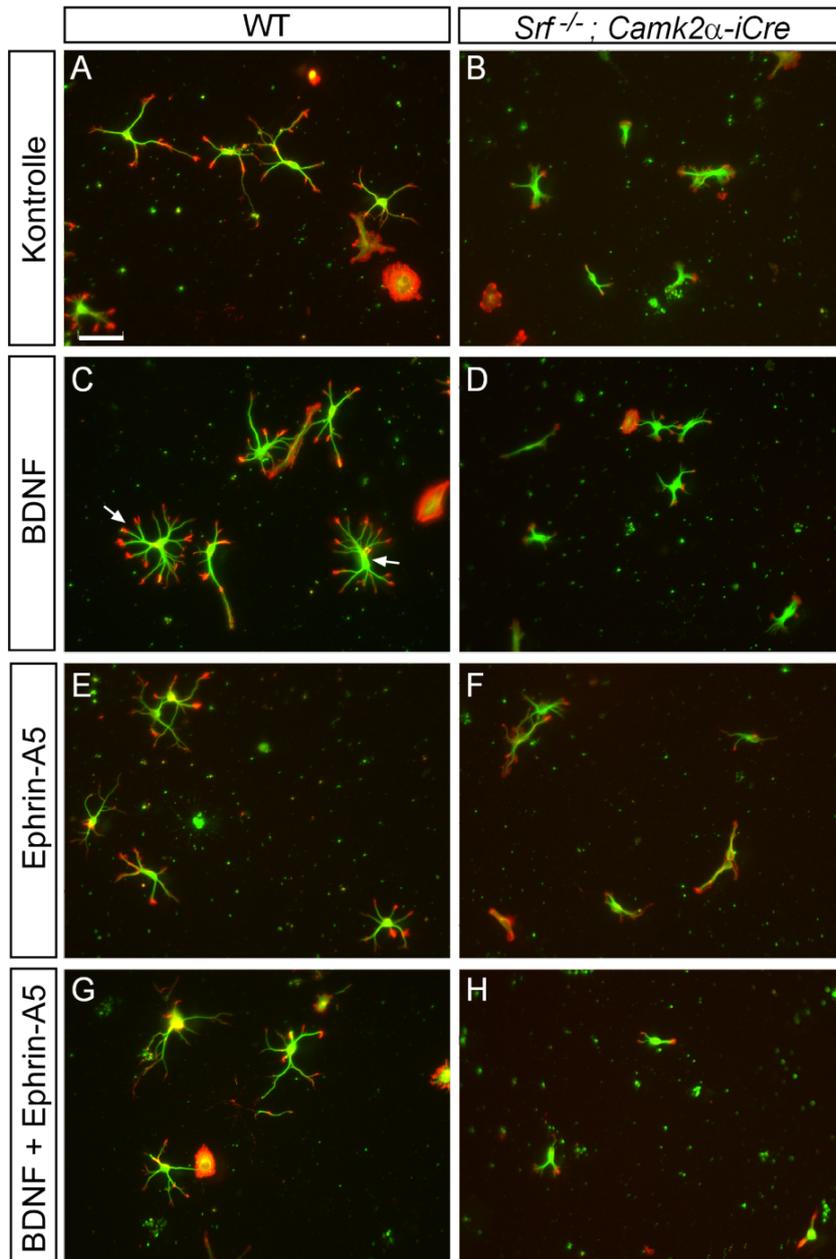
*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Maßstab (A, C, E, G, I, K, M, O) = 10 μm ; (B, D, F, H, J, L, N, P) = 2 μm

3.2.2 Die BDNF-induzierte Neuritenverzweigung wird durch vorwärts-gerichtete EphA-Signaltransduktion in Abhängigkeit von SRF antagonisiert

Neben dem Effekt der beiden Lenkungsmoleküle auf die Wachstumskegelmotilität (**Abb. 3.7**) wurde im nächsten Experiment die Wirkung der Substanzen auf die Neuritenformation und Neuritenverzweigung untersucht (**Abb. 3.8**, siehe Quantifizierung in **Abb. 3.8I, J**). Verglichen mit unstimulierten Neuronen steigert BDNF die Anzahl der Primärneuriten sowie die sekundären Neuritenverzweigungen (**Abb. 3.8C**). Dieser positive Effekt von BDNF auf die Neuriten (Yue et al., 2008) unterstützt sehr gut zuvor publizierte Resultate (Lowenstein and Arsenault, 1996). Eine alleinige Ephrin-A5 Applikation hingegen zeigt keinen Effekt auf die Neuritenanzahl und Verzweigungen (**Abb. 3.8E**). Werden nun die Neurone mit beiden Lenkungsmolekülen gleichzeitig stimuliert, antagonisiert Ephrin-A5 den BDNF-stimulierte Neuritenbildung und Anzahl der Verzweigungen (**Abb. 3.8G**). Auch für diesen Versuch galt es herauszufinden, ob für diesen Prozess die Genaktivität von SRF benötigt wurde. In *Srf*-Mutanten zeigt weder eine Stimulation mit BDNF (**Abb. 3.8D**) und/ oder Ephrin-A5 (**Abb. 3.8F**) einen Effekt auf die Neuritenanzahl und Verzweigungen. Vielmehr sind wieder die typischen abgerundeten

Wachstumskegel und fehlenden Filopodien erkennbar. Dieser Versuch untermauert das Ergebnis der Untersuchung der Wachstumskegelmotilität (Abb. 3.7). Somit wird für die BDNF-induzierte Anzahl der Neuriten und Verzweigungen ebenso die Aktivität von SRF benötigt, wie auch schon für die BDNF-induzierte Wachstumskegelmotilität.



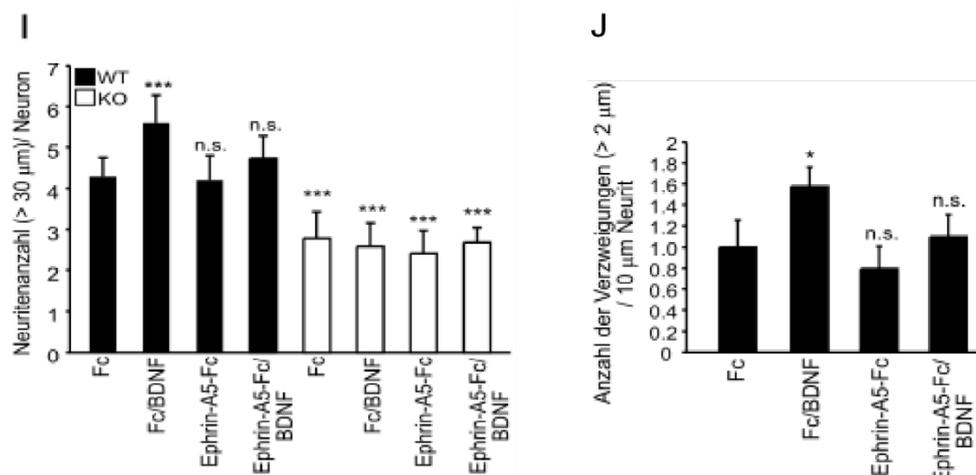


Abb. 3.8. Die BDNF-induzierte Neuritenverzweigung wird durch Ephrin-A5 antagonisiert.

Hippocampale Kulturen wurden mit den angegebenen Applikationskombinationen für drei Tage auf Ephrin-A5 und BDNF beschichteten Deckgläsern inkubiert. Anschließend wurden F-Aktin (rot) und Mikrotubuli (grün) angefärbt. (A, B) Unbehandelte Wildtyp-Neurone weisen mehrere und längere Neuriten auf (A) als SRF-defiziente Neurone (B). (C, D) BDNF erhöht die Neuritenanzahl in Wildtyp-Neuronen (Pfeile in C), aber nicht in SRF-defizienten Neuronen (D). (E, F) Ephrin-A5 verändert nicht die Neuritenanzahl in Wildtyp-Neuronen (E) und SRF-mutierten Neuronen (F). (G, H) Ephrin-A5 antagonisiert den BDNF-stimulierten Anstieg der Neuritenverzweigungen in Wildtyp-Neuronen (G). In SRF-defizienten Neuronen ist durch Ko-Applikation von BDNF und Ephrin-A5 jedoch keine Veränderung der Neuritenanzahl und -verzweigungen erkennbar (H).

(I, J) Quantifizierung der durchschnittlichen Neuritenanzahl (I) und Verzweigungen (J)

Statistische Signifikanz wurde in Beziehung zu Wildtyp/ Kontrolle berechnet.

*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (SA).

Maßstab (A-H) = 50 µm

3.2.3 EphA-Signaltransduktion wirkt der BDNF-induzierten Wachstumskegelmotilität entgegen

In einem nächsten Versuch wurde eine Ephrin-A5 Titrationsreihe durchgeführt (Abb. 3.9). Hierdurch sollte überprüft werden, wie sich die Signalstärke von Ephrin-A5 bezüglich der Motilität des Wachstumskegels gegenüber dem Effekt von BDNF verhält.

Wie in Abb. 3.9 ersichtlich, nimmt mit steigender Ephrin-A5 Konzentration die Fläche des Wachstumskegels ab (Abb. 3.9A), was mit einer Zunahme des Wachstumskegelskollapses korreliert (Daten nicht gezeigt). Eine Konzentrationsabhängigkeit ist ebenso bei der durchschnittlichen Filopodienlänge sowie der Anzahl der Filopodien pro Wachstumskegel zu verzeichnen (Abb. 3.9B,C). Mit steigender Ephrin-A5 Konzentration nimmt die Filopodienlänge sowie Filopodienanzahl ab und erreicht bei der geringsten Konzentration (0,1 µg/ml)

Kontrollniveau. BDNF hingegen zeigt, wie auch schon in **Abb. 3.7A-C** verdeutlicht, einen positiven Effekt auf die Wachstumskegelmotilität (**Abb. 3.9A- C**). Hierbei wird durch Stimulation mit dem Neurotrophin die Wachstumskegelfläche (**Abb. 3.9A**) sowie die Filopodienlänge (**Abb. 3.9B**) und Filopodienanzahl (**Abb. 3.9C**) erhöht. Nach Ko-Applikation beider Lenkungsmoleküle nimmt der BDNF-induzierte positive Effekt auf die Wachstumskegelmotilität mit steigender Ephrin-A5 Konzentration ab (**Abb. 3.9**). Eine simultane Stimulation mit den Lenkungsmolekülen führt zu einer Blockierung der BDNF-induzierten Wachstumskegelvergrößerung (**Abb. 3.9A**). Je niedriger die Ephrin-A5-Fc Konzentration ist, desto schwächer wird der BDNF-induzierten Erhöhung der Wachstumskegelfläche entgegengewirkt. Bezüglich der Filopodienlänge führt eine simultane Lenkungsmolekülapplikation ebenso zu einer Inhibierung des BDNF-induzierten Effekts, wobei Ephrin-A5 Konzentrationen von 0,5 µg/ ml und 1 µg/ ml die stärkste Wirkung entfalten (**Abb. 3.9B**). Die BDNF-induzierte Erhöhung der Filopodienlänge wird bei diesen beiden Ephrin-A5 Konzentrationen gehemmt. Wird eine Konzentration von 0,1 µg/ml Ephrin-A5-Fc mit dem Neurotrophin koappliziert, so hat Ephrin-A5 einen etwas schwächeren inhibierenden Effekt auf die BDNF-induzierte Erhöhung der Filopodienlänge. Eine gleichzeitige Stimulation mit Ephrin-A5 und BDNF führt ebenso wie in **Abb. 3.9A, B** zu einer Ephrin-A5 vermittelten Hemmung der BDNF-induzierten Erhöhung der Filopodienanzahl (**Abb. 3.9C**). Hierbei zeigen alle drei Ephrin-A5-Konzentrationen (0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml) den gleichen Einfluss bezüglich der Neurotrophin-inhibierende Wirkung.

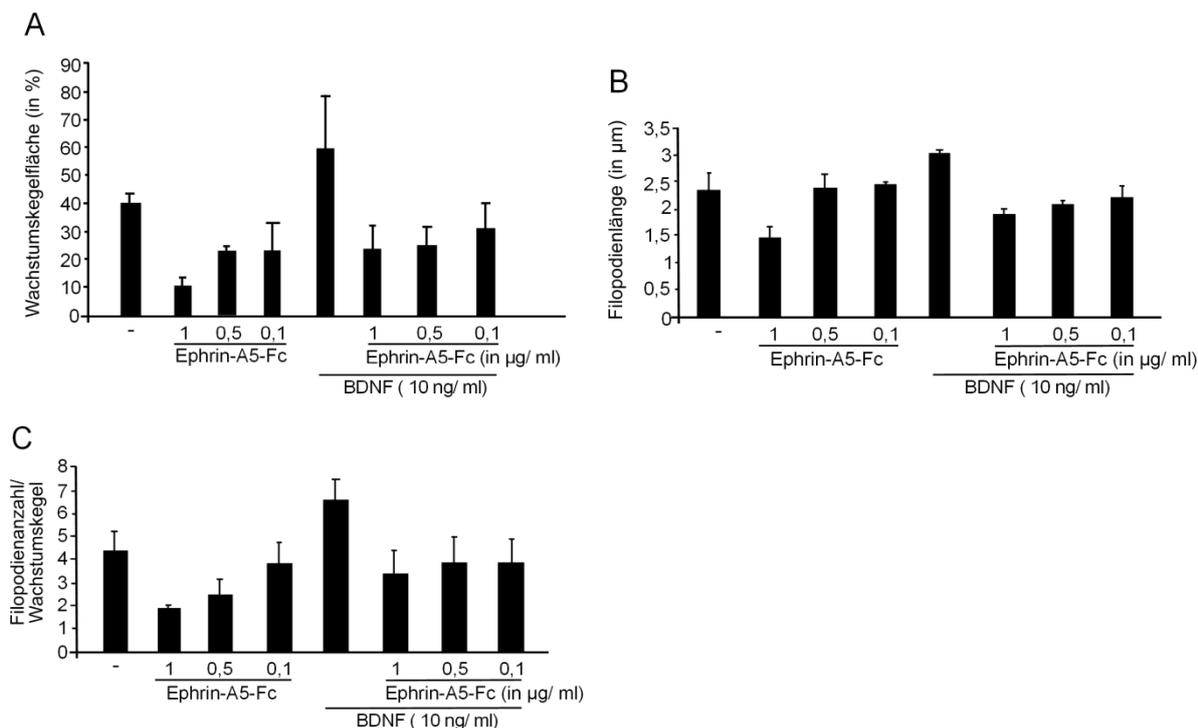


Abb. 3.9. Titrationsreihe zur Untersuchung der Wirkstärke von Ephrin-A5 gegenüber BDNF.

Hippocampale Wildtyp- Neurone wurden 1 div kultiviert und anschließend für 30 min mit 10 ng/ ml BDNF und/ oder Ephrin-A5 mit 3 unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml und 1 µg/ml) stimuliert und anschließend die Wachstumskegelgröße, Filopodienanzahl/ Wachstumskegel und Filopodienlänge gemessen.

(A) Quantifizierung der Wachstumskegelgröße. Eine simultane Stimulation beider Lenkungsmoleküle führt zu einer Blockierung der BDNF-induzierten Wachstumskegelvergrößerung. Mit sinkender Ephrin-A5 Konzentration ist tendenziell eine Abnahme des BDNF-inhibierenden Effekts zu beobachten.

(B) Quantifizierung der durchschnittlichen Filopodienlänge. Eine simultane Applikation führt zu einer Inhibierung der BDNF-induzierten Erhöhung der Filopodienlänge unter allen verwendeten Ephrin-A5 Konzentrationen.

(C) Quantifizierung der Filopodienanzahl/ Wachstumskegel. Bei gleichzeitiger Stimulation von Ephrin-A5 und BDNF wirkt Ephrin-A5 der BDNF-induzierten Erhöhung der Filopodienanzahl entgegen. Dieser Effekt ist bei allen 3 Ephrin-A5 Konzentrationen gleich.

Eine weitere Möglichkeit, um zu überprüfen ob die Ephrin-A5-Signalstärke der BDNF-Signalstärke überwiegt, stellt eine zeitliche Modifikation der Stimulationsabfolge dar. In vorangegangenen Experimenten (**Abb. 3.7, Abb. 3.8., Abb. 3.9**) beruhte die Applikation der beiden Lenkungsmoleküle BDNF und Ephrin-A5 auf einen 30- oder 45- minütigen gleichzeitigen Stimulationszeitraum. Im folgenden Experiment erfolgte neben der alleinigen Stimulation hippocampaler Neurone mit BDNF und Ephrin-A5 auch eine Stimulation mit beiden Lenkungsmolekülen gleichzeitig in drei verschiedenen Varianten (siehe Schemata **Abb. 3.10A**). Die erste Variante stellte die in vorherigen Experimenten verwendete 45-minütige gleichzeitige Stimulation dar (in **Abb.3.10** mit **1** gekennzeichnet). Des Weiteren wurde für einen Zeitraum von 30 min zuerst mit BDNF stimuliert, bevor dann für

weitere 45 min Ephrin-A5 ko-appliziert wurde (in **Abb.3.10** mit **2** gekennzeichnet). Die dritte Variante sah vor, die Primärkulturen zuerst für 30 min mit Ephrin-A5 zu stimulieren, bevor anschließend für weitere 45 min mit BDNF ko-stimuliert wurde (in **Abb.3.10** mit **3** gekennzeichnet). Unter alleiniger BDNF Stimulation zeigt sich erneut der positive Effekt auf den Wachstumskegel verglichen mit Kontrollneuronen. Die Gesamtwachstumskegelfläche sowie die Anzahl der Filopodien steigen nach Applikation mit dem Neurotrophin (**Abb. 3.10B, c**). Ephrin-A5 wirkt wie erwartet gegensätzlich und resultiert in einer verminderten Wachstumskegelfläche sowie Filopodienanzahl (**Abb. 3.10B, c**). Bei gleichzeitiger Applikation bestätigt die Stimulationsvariante **1** ebenso vorangegangene Daten (**Abb. 3.7.** und **Abb. 3.9**). Ephrin-A5 antagonisiert den BDNF-induzierten Effekt auf die Wachstumskegelmotilität. Erfolgt nun, wie in Stimulationsvariante **2**, eine 30 minütige Vorinkubation mit BDNF und anschließender Ko-Stimulation mit Ephrin-A5 für weitere 45 min, so ist auch hier zu beobachten, dass Ephrin-A5 den BDNF-induzierten Effekt antagonisiert. Bei dieser Stimulationsform ist die Wirkung etwas abgeschwächt gegenüber der Applikationsvariante **1**. Auch bei der letzten Stimulationsmöglichkeit **3** ist zu beobachten, dass der BDNF-vermittelte Effekt auf den Wachstumskegel durch Ephrin-A5 inhibiert wird, mit gleicher Wirkung wie bei der Applikationsvariante **1**. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es unter allen drei Stimulationsvarianten zu einer Hemmung des BDNF-vermittelten positiven Effekt auf den Wachstumskegel durch Ephrin-A5 führt, was darauf hinweist, dass die Wirkung von Ephrin-A5 gegenüber BDNF überwiegt. Um jedoch eindeutige Schlüsse ziehen zu können, wäre in diesem Experiment eine zweite, wesentlich niedrigere Konzentration von Ephrin-A5 zu testen.

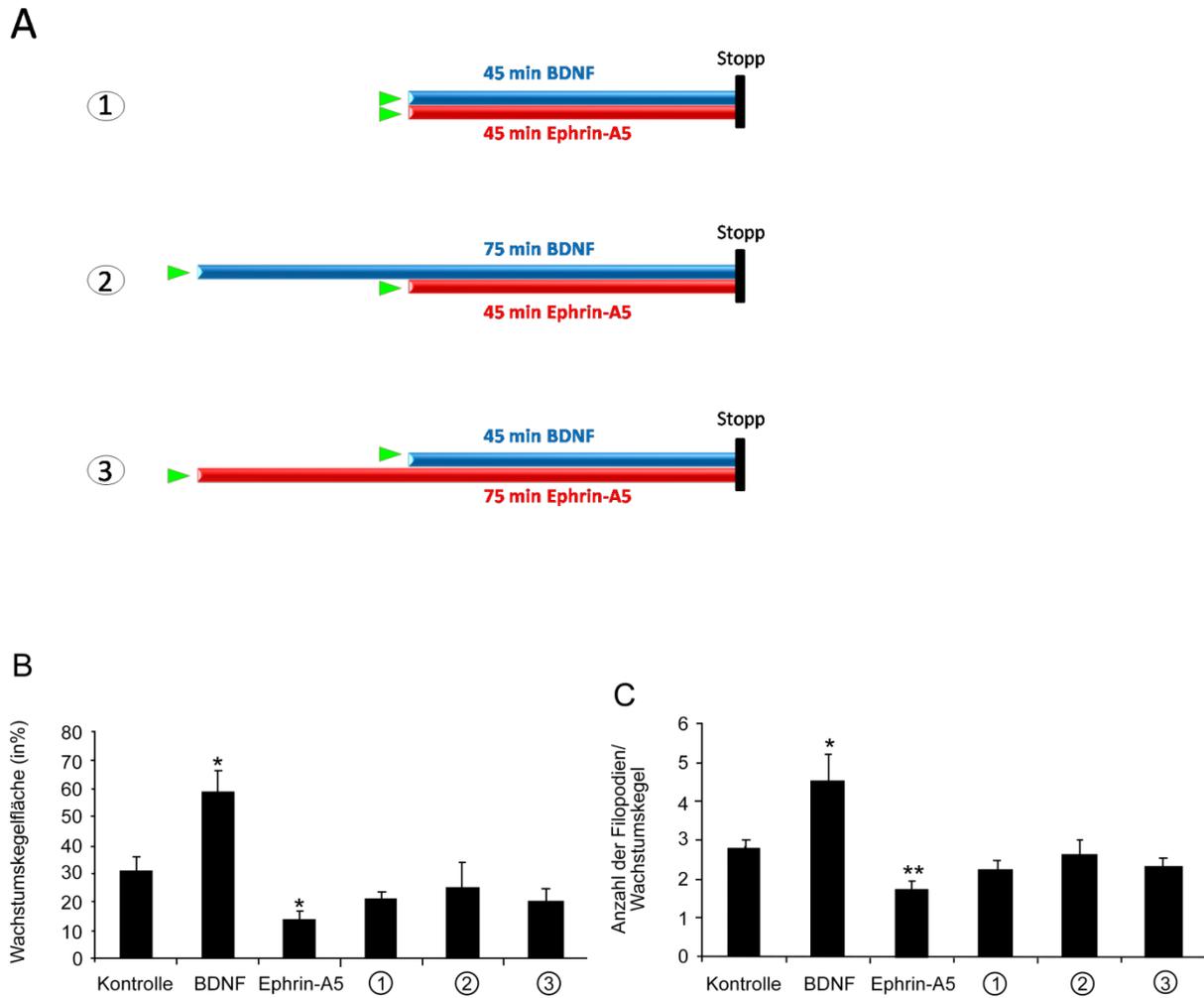


Abb. 3.10. Effekt der Lenkungsmoleküle BDNF und Ephrin-A5 auf die Wachstumskegelmotilität nach modulierter zeitlicher Abfolge der Applikation.

Hippocampale WT-Neurone wurden 1div kultiviert und anschließend für 45 min mit 10 ng/ml BDNF, 1 µg/ml Ephrin-A5-Fc oder mit BDNF und Ephrin-A5 gleichzeitig. Anschließend wurde die Wachstumskegelfläche und Filopodienanzahl jeder Bedingung bestimmt.

(A) Schemata der drei unterschiedlichen Stimulationsvarianten einer BDNF/Ephrin-A5 Stimulation. Grüne Pfeile weisen auf Stimulationsstart hin. Variante 1: gleichzeitige 45 minütige Applikation von BDNF und Ephrin-A5. Variante 2: 30 minütige Vorinkubation mit BDNF und anschließende Koapplikation von Ephrin-A5. Variante 3: 30 minütige Ephrin-A5 Vorstimulation und anschließend für weitere 45 min mit BDNF kostimuliert.

(B) Quantifizierung der Wachstumskegelfläche. BDNF vergrößert die Fläche, Ephrin-A5 verkleinert sie. Unter Variante 1, 2 und 3 wird der BDNF-induzierte Effekt durch Ephrin-A5 antagonisiert.

(C) Quantifizierung der durchschnittlichen Filopodienanzahl. BDNF erhöht die Anzahl, Ephrin-A5 verkleinert sie. Unter Variante 1, 2 und 3 wird der BDNF-induzierte Effekt durch Ephrin-A5 antagonisiert.

Statistische Signifikanz wurde im Bezug zur unstimulierten Kontrolle berechnet.

*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (SA).

3.2.4 Verteilung der Lenkungsmoleküle im Hippocampus

Es ist bekannt, dass sich das Lenkungsmolekül BDNF und sein korrespondierender Rezeptor TrkB vornehmlich auf hippocampalen Moosfaseraxonen befinden (Conner et al., 1997; He et al., 2002; Yan et al., 1997). Für Ephrin-A5 ist die Bestimmung der Lokalisation weitaus komplizierter, da sich aufgrund der Vielzahl von Liganden und Rezeptorklassen (siehe Einleitung 1.1.2) eine Vielzahl von EphA-Ephrin-Bindungskombinationen erschließen (Pasquale, 2008). Die Lokalisation der Ephrine auf Proteinebene ist bis dato nur ungenügend untersucht, jedoch weisen mRNA Studien auf die Lokalisation von Ephs und Ephrinen in der CA-Zellkörperschicht und dem Gyrus dentatus des Hippocampus hin (Murai and Pasquale, 2003; Otal et al., 2006; Yue et al., 2002). Um die Verteilung der Eph-Rezeptoren und ihrer Liganden auf Proteinebene zu untersuchen, wurden an alkalische Phosphatase (AP) gekoppelte EphA3 und Ephrin-A5 Fusionsproteine (AP-EphA3 und AP-Ephrin-A5) verwendet (**Abb. 3.11**). Hierbei bindet das AP-EphA3 Konstrukt an Ephrine und das AP-Ephrin-A5 Konstrukt an EphA-Rezeptoren. Da sich die Entwicklung der hippocampalen Moosfasern über einen längeren Zeitraum erstreckt (ausführlichere Erläuterung siehe 1.1.4.4), wurden unterschiedliche Entwicklungsstadien gewählt (P3, P7, P14).

Im Gegensatz zu den mRNA Expressionsdaten sind EphA-Rezeptoren nur schwach in der Zellkörperschicht der CA-Region und des Gyrus dentatus exprimiert (**Abb. 3.11A, C, E**). Vielmehr wurde eine Expression in der Zellkörperregion anschließenden Dendriten-reichen Schicht der CA-Region (*Stratum lucidum*) beobachtet (gekennzeichnet durch Pfeile). Interessanter Weise konnte keine EphA-Rezeptorexpression auf Moosfasern nachgewiesen werden. Es ist zu vermuten, dass diese bereits an in der Umgebung der hippocampalen Moosfaseraxone befindliches Ephrin, i.e. endogenes Ephrin, gebunden haben, und somit eine Bindung des exogen applizierten Fusionsproteins verhindert wird. Auf diesen Effekt der „Maskierung“ wird in der Diskussion noch genauer eingegangen (siehe 4.1.1).

Die Expression der Ephrin-As verhält sich ähnlich wie die der EphA-Rezeptoren. Auch hier ist die höchste Expression im *Stratum lucidum* der CA2-Region zu verzeichnen (**Abb. 3.11B, D, F**), wobei dieses Erscheinungsbild in P14 Mäusen am stärksten ausgeprägt ist.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es auf Proteinebene zu einer überlappenden Expression der Ephrin-As und ihren Rezeptoren kommt, mit der stärksten Ausprägung im dendritischen Gebiet der CA-Region.

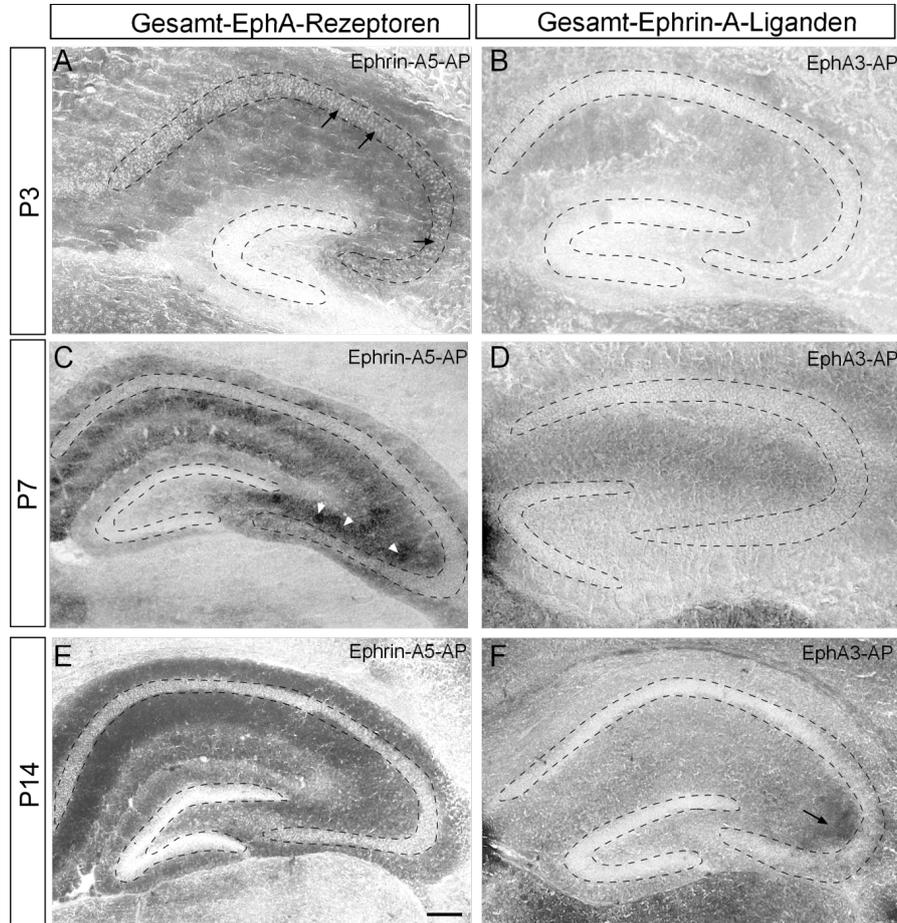


Abb. 3.11. Expression der EphA-Rezeptoren und Ephrin-A-Liganden im Hippocampus

Kryostatschnitte wurden von P3 (A, B), P7 (C, D) und P14 (E, F) Mäusen angefertigt. Gesamt-EphA-Rezeptoren (A, C, E) wurden mittels Ephrin-A5-AP angefärbt, Ephrin-As (B, D, F) mittels EphA3-AP.

(A, C, E) EphA-Rezeptoren sind hauptsächlich in der Region der CA3-Dendriten lokalisiert und weniger auf Moosfaserbündel und der DG-Region. Bei P3 (A) sind einige EphA-Signale in der CA3-Zellkörperschicht sichtbar (gekennzeichnet durch Pfeil).

(B, D, F) Die Expression der Ephrin-As überlappt teilweise mit den EphA-Rezeptoren im *Stratum lucidum*. Die Verteilung der Ephrin-As ist dem der EphA-Rezeptoren ähnlich. Es ist nur eine schwache Lokalisation in der DG- oder CA-Zellkörperregion zu verzeichnen. Bei P14 (F), akkumulieren Ephrin-As in der CA2-Region des *Stratum lucidum* (gekennzeichnet durch Pfeil).

Maßstab (A-F) = 100 µm

3.2.5 Ephrin-A5 und BDNF beeinflussen die Wegfindung hippocampaler Moosfasern

In den vorangeführten Versuchen wurde die axonale Wegfindung hippocampaler Neurone stets in *in-vitro* Experimenten untersucht. Dies spiegelt bei Weitem nicht die komplexen Vernetzungen und Interaktionen der Nervenzellen im lebenden Organismus wieder. Deshalb wurde in einem nächsten Versuchsaufbau, wie schon in 3.1.2 beschrieben, auf die *in-vivo* nahe Methode der organotypischen Schnittkultur (Stoppini et al., 1991) zurückgegriffen. Wie in der Einleitung unter 1.1.4 ausführlich erklärt, bilden die Moosfaseraxone im *Stratum lucidum* Synapsen mit den Dendriten der Pyramidenzellen aus (schematische Darstellung siehe **Abb. 3.12**). Unter natürlichen Bedingungen terminieren sie folglich niemals innerhalb der Zellkörperschicht (*Stratum pyramidale*).

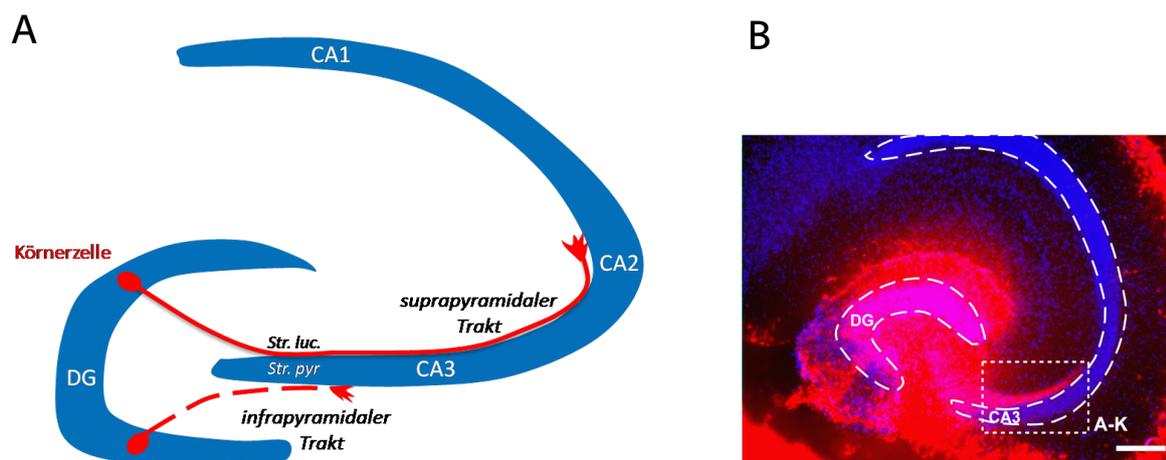


Abb. 3.12. Schematische Darstellung und Übersichtsbild der hippocampalen Moosfaserwegfindung.

(A) Moosfasern des Gyrus dentatus bilden Synapsen mit den Dendriten der CA3- Pyramidenzellen aus. Hierbei verläuft der Faserstrang stets innerhalb des *Stratum lucidum* und vermeidet das *Stratum pyramidale*.

(B) Übersichtsbild eines angefertigten hippocampalen Schnittes. Moosfasertrakte wurden mittels des lipophilen Farbstoffes Dil angefärbt (rot). Die Zellkörper wurden mit DAPI angefärbt und sind mit blau dargestellt. Innerhalb des gestrichelten Kästchens ist der suprapyramidale Trakt zu sehen. Dieser verläuft oberhalb der CA3-Zellkörperschicht. In **Abb. 3.13** zeigen die Bilder (A- K) diesen Ausschnitt.

DG = Gyrus dentatus; Str.luc. = *Stratum lucidum*; Str. pyr. = *Stratum lucidum*; CA = cornu ammonis (Ammonshorn)
Maßstab (B) = 200 µm

Die organotypischen Schnittkulturen wurden mittels Badapplikation entweder mit PBS (Kontrolle), BDNF, Ephrin-A5 oder mit beiden Substanzen gleichzeitig stimuliert (**Abb. 3.13**). Im Fokus der Auswertungen steht der suprapyramidale Trakt (siehe Schema und Übersichtsbild **Abb. 3.12**) Dieser ist aufgrund seiner Lage und Größe effektiver als der infrapyramidale Trakt zu markieren und damit besser auszuwerten. In der Kontrollsituation (**Abb. 3.13A- C**, siehe Quantifizierung in **Abb. 3.13M**) terminiert das suprapyramidale Bündel (hervorgehoben durch einen weißen Pfeil) korrekt außerhalb der CA3-Zellkörperschicht (*Stratum pyramidale*; durch gestrichelte Linien markierter Bereich) im *Stratum lucidum*. Erfolgt eine Stimulation mit BDNF wird ersichtlich, dass die Moosfasern nun nicht mehr korrekt im *Stratum lucidum* terminieren, sondern eine Defaszikulierung des Moosfaserbündels zu beobachten ist, dessen Axone nun zum Teil in die CA3-Zellkörperschicht fehlgeleitet werden (**Abb. 3.13D- F**). Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen somit auf einen wachstumsfördernden Effekt von BDNF auf die Moosfasern hin. In der Literatur sind bezüglich der Wirkung des neurotrophen Lenkungsmoleküls widersprüchliche Resultate erzielt worden. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass das Moosfaseraussprossen (engl. „*sprouting*“) durch BDNF gefördert wird (Danzer et al., 2002). Gegenteilig dazu wurde beobachtet, dass eine pharmakologische Inhibierung des TrkB-Rezeptors zu einer Defaszikulierung der Moosfaserbündel führt, was schlussfolgernd BDNF einen eher repulsiven Effekt auf die Moosfasern zuschreiben würde (Tamura et al., 2006). Bisher wurde die Wirkung von Ephrin-A5 auf suprapyramidale Moosfaserbündel noch nicht untersucht. Bekannt ist jedoch, dass die repulsive Wirkung von Ephrin-A5 entscheidend an der korrekten Verschaltung hippocampaler Kommissuralfasern und des infrapyramidalen Bündels beteiligt ist (Otal et al., 2006). So führt eine Stimulation der hippocampalen Schnittkulturen mit Ephrin-A5-Fc (**Abb. 3.13G- I**) interessanter Weise zu einem ähnlichen Resultat wie mit BDNF beobachtet. Die Moosfasern weisen auch hier eine Defaszikulierung und ein aberrantes Wachstum in die CA3-Zellkörperschicht auf. Dieser Effekt scheint durch gleichzeitige Applikation der Lenkungsmoleküle potenziert zu werden (**Abb. 3.13J- L**). Hierbei ist ein noch massiveres Eintreten der Moosfaserbündel in das *Stratum pyramidale* zu verzeichnen (**Abb. 3.13J, M**).

Zusammenfassend wird deutlich, dass die Lenkungsmoleküle BDNF und Ephrin-A5 die Wegfindung suprapyramidaler Moosfasern beeinflussen.

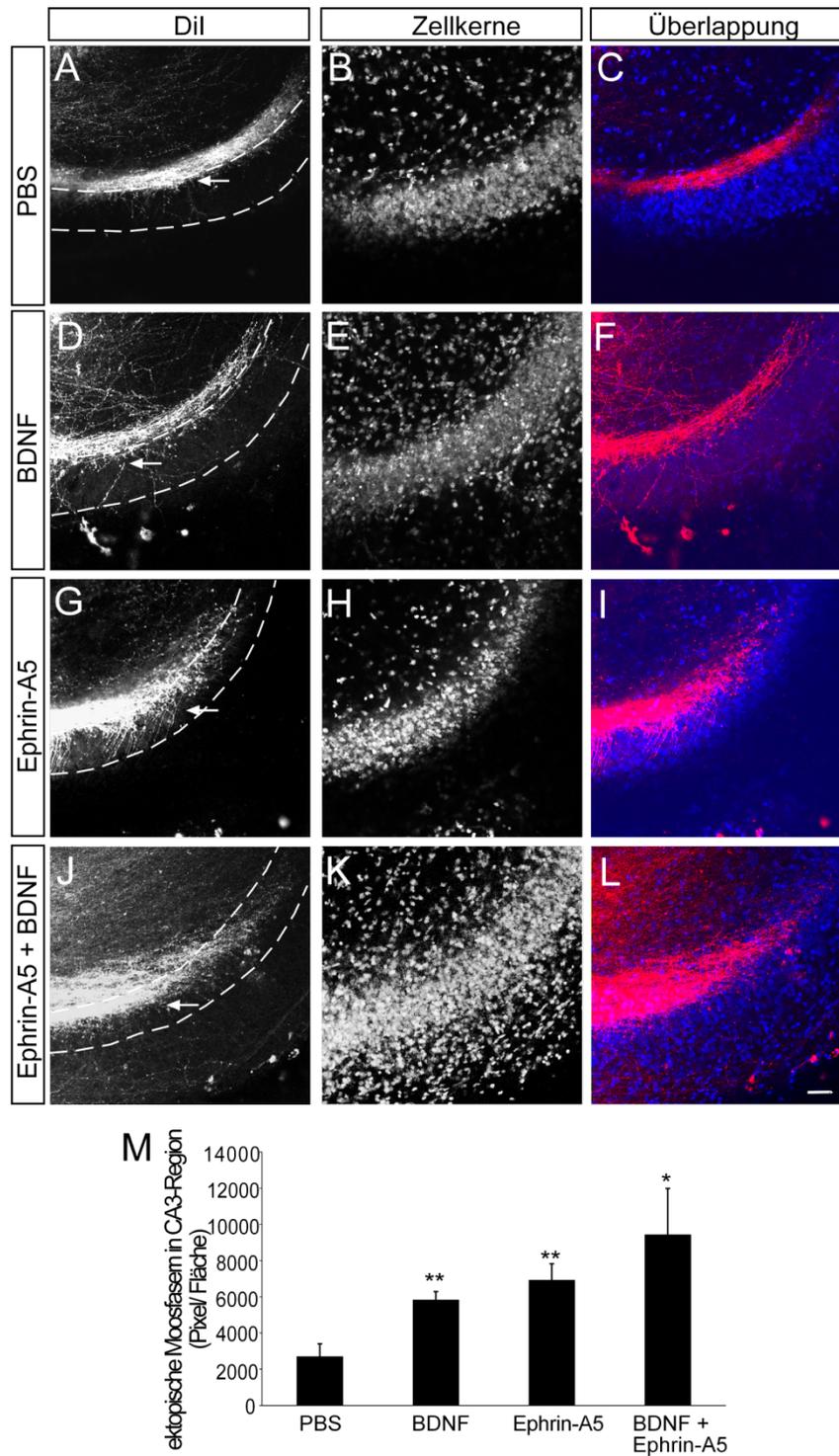


Abb. 3.13. Das Moosfaserwachstum wird durch vorwärts-gerichtete EphA- und Neurotrophin-Signalweiterleitung beeinflusst.

Hippocampale Schnittkulturen wurden von Wildtypmäusen (P5-P6) angefertigt und suprapyramidale Moosfaserbündel mittels Dil (rot) markiert und Zellkörper mit DAPI (blau) angefärbt. Eine Stimulation der Kulturen erfolgte durch Badapplikation mit PBS (Kontrolle), BDNF und/ oder Ephrin-A5-Fc für 2 div. Die CA3-Zellkörperschicht (*Str. pyramidale*) ist durch gestrichelte Linien hervorgehoben.

(A- C) Moosfaseraxone verlaufen in der Kontrollsituation im *Stratum lucidum*, oberhalb des *Str. pyramidale*. Nur sehr wenige Verzweigungen in die CA3-Zellkörperschicht sind zu verzeichnen (gekennzeichnet durch weißen Pfeil).

(D- E) BDNF-Applikation führt zu einer ektopischen Moosfaserverzweigung in das *Str. pyramidale*.

(F- H) Ephrin-A5 Applikation führt ebenfalls wie BDNF zu einer ektopischen Moosfaserverzweigung in die Zellkörperschicht der CA3-Region (weißer Pfeil).

(I- K) Eine simultane Applikation mit BDNF und Ephrin-A5 scheint die aberrante Moosfaserverzweigung zu potenzieren.

(L) Quantifizierung der ektopischen Moosfasern in die CA3-Region.

*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Maßstab (A- K) = 50 μm

Anzahl unabhängiger Experimente $n = 3$, pro Experiment je 5 Mäuse

3.2.6 Ephrin-A5 wirkt der BDNF-Signaltransduktion durch Inhibierung der MAPK-Aktivität entgegen

Die vorangegangenen *in-vitro* Analysen der Wachstumskegelmorphologie und Neuritenformation/ -verzweigung (siehe **Abb. 3.7** und **Abb. 3.8**) weisen auf eine Interaktion von Ephrin-A5 und BDNF hin. Es galt nun zu untersuchen, welche molekularen Mechanismen dieser Beobachtung zugrunde liegen. Spezieller Fokus wurde auf den MAPK-Signalweg gelegt, da sowohl Ephrine als auch Neurotrophine diesen Signaltransduktionsweg beeinflussen (siehe 1.1.3.1). So ist bekannt, dass Neurotrophine die MAPK ERK1/2 durch TrkB-Rezeptoraktivierung aktivieren (Arevalo and Wu, 2006; Reichardt, 2006). Abhängig vom Zelltyp und von der Eph-Rezeptorklasse können Ephrine die MAPK sowohl inhibieren (Elowe et al., 2001; Miao et al., 2001) als auch aktivieren (Aoki et al., 2004). Prinzipiell werden durch die Aktivierung, bzw. Inaktivierung der MAP-Kinase Kaskade neben ERK1/2 u.a. auch JNK, p38 oder ERK5 beeinflusst. Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt jedoch auf der MAP-Kinase ERK1/2.

Zur Untersuchung dieses Sachverhaltes wurden proteinbiochemische Versuche durchgeführt (**Abb. 3.14**). Hierfür erfolgte die Kultivierung kortikaler Neurone, mit anschließender BDNF und/ oder Ephrin-A5 Stimulation. Änderungen der Proteinmenge oder des Phosphorylierungsstatus verschiedener Signalmoleküle wurden mittels des Western-Blot-Verfahrens detektiert.

Die Stimulation kortikaler Neurone mit Ephrin-A5 (**Abb. 3.14A**) führt zu einer rapiden Rezeptoraktivierung, was an der ansteigenden Menge des phosphorylierten EphA3-Rezeptors (P-EphA3) zu erkennen ist. Gleichzeitig erfolgt durch Rezeptoraktivierung eine Inhibierung der MAP-Kinase ERK1/2, verdeutlicht durch die verminderten Menge von phosphoryliertem ERK1/2 (P-ERK). Bei der Detektion von ERK1/2, bzw. dessen phosphorylierte Form, sind zwei Banden zu erkennen. Hierbei handelt es

sich bei der höheren Bande um das 44 kD große ERK1 und bei der tieferen um dessen 42 kD große Isoform ERK2. Folglich wird die MAPK ERK1/2 auch als p44/42 bezeichnet. Eine Stimulation mit BDNF führte erwartungsgemäß zu einer Erhöhung des phosphorylierten ERK1/2 (**Abb. 3.14B**). Kürzlich konnte für hippocampale Neurone gezeigt werden, dass durch eine gleichzeitige Applikation beider Lenkungsmoleküle die BDNF-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 durch Ephrin-A5 inhibiert wird (Yue et al., 2008). Dieses Resultat wird durch die Daten in dieser Arbeit bestätigt und unterstützt, da auch hier die BDNF-induzierte Aktivierung von ERK durch Ephrin-A5 inhibiert wurde (**Abb. 3.14B**). Eine EphA-Rezeptoraktivierung ist gut erkennbar durch den raschen Anstieg der Menge des phosphorylierten EphA3 Rezeptors nach Ligandenzugabe, verglichen mit der Kontrollsituation. Eine gleichzeitige Applikation mit BDNF zeigte keine Veränderung gegenüber alleiniger Ephrin-A5 Stimulation. Analog verhält es sich mit der TrkB-Rezeptoraktivierung durch BDNF. Eine Veränderung der Gesamt-EphA/ TrkB-Rezeptormenge ist nicht zu beobachten (**Abb. 3.14B**).

Als Ladekontrolle dienten für dieses Experiment GAPDH, sowie Gesamt-ERK, EphA4 und TrkB, da die Gesamtmenge dieser Proteine weitgehend unverändert bleibt. Ein geeigneter EphA3-Antikörper war nicht vorhanden, weshalb auf EphA4 zurückgegriffen wurde. Da Ephrin-A5 mit etwa gleicher Affinität an den EphA4- wie auch den EphA3-Rezeptor bindet, konnte dieser sehr gut als Ladekontrolle verwendet werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die vorwärts-gerichtete EphA-Signalweiterleitung zu einer Inhibierung der MAP-Kinase ERK1/2 führt. Die BDNF-induzierte Aktivierung von ERK1/2 wird durch gleichzeitige Anwesenheit von Ephrin-A5 gehemmt.

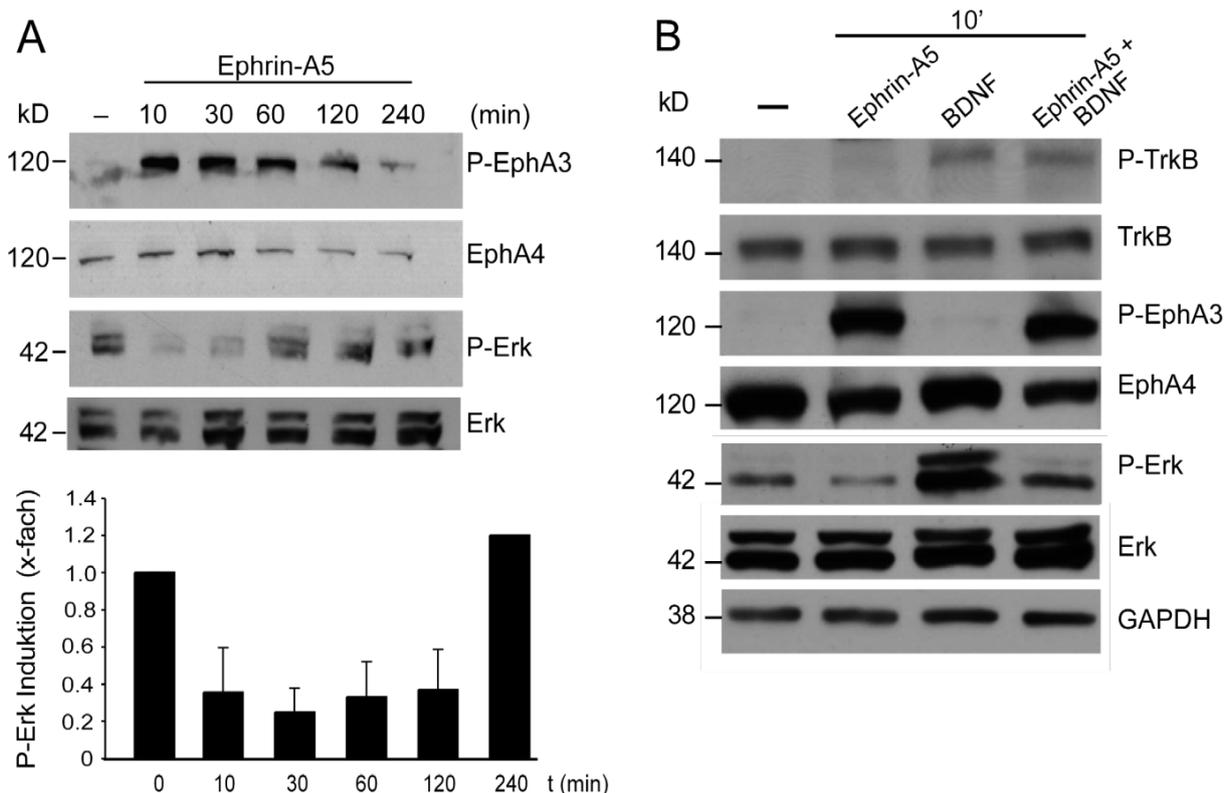


Abb. 3.14. Ephrin-A5 inhibiert die MAP-Kinasen ERK1/2 und wirkt der BDNF-induzierten Aktivierung von ERK1/2 entgegen.

Kortikale Neurone von E17,5 Mäuseembryonen wurden 4 div kultiviert und mit den angegebenen Lenkungsmolekülen stimuliert. Proteinlysate wurden hergestellt und 10 µg Protein in ein 10 %-iges Acrylamidgel geladen und die entsprechenden Proteine mittels Western Blot detektiert (A, B). Die Zahlen links des Blots geben die Markerbanden in kDa an.

(A) Unterschiedlich lange Stimulation mit Ephrin-A5. Bereits nach 10 min ist eine Verminderung von P-ERK zu erkennen. Dieser Effekt hält 2h an. Nach 4h wird die Ausgangsmenge von P-ERK wieder erreicht. Unterhalb des Blots ist die Quantifizierung der phosphorylierten ERK1/2 Menge dargestellt. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

(B) Stimulation mit BDNF und/ oder Ephrin-A5 für 10 min. BDNF erhöht die Aktivität von ERK1/2. Durch Ephrin-A5 ist eine Abnahme der BDNF-induzierten P-ERK Menge zu verzeichnen.

3.2.7 An der Inhibierung der ERK1/2-Aktivität durch Ephrin-A5 sind Phosphatasen beteiligt

Im Folgenden sollte herausgefunden werden, welcher Mechanismus der Inhibierung der ERK-Phosphorylierung durch EphA-Rezeptoraktivierung zugrunde liegt. Ein möglicher Ansatzpunkt stellen Phosphatasen dar. Ihre Beteiligung an der Regulation der MAP-Kinasen ist unumstritten (Caunt et al., 2008; Theodosiou and Ashworth, 2002). Bei der Entwicklung des visuellen Systems im Xenopus regulieren

Phosphatasen das axonale Wachstum der retinalen Ganglienzellen (Johnson et al., 2001). Zudem konnte kürzlich ein Zusammenhang zwischen dem EphA-vermittelten Wachstumskegelkollaps in hippocampalen Neuronen und Phosphatasen gezeigt werden (Yue et al., 2008).

Um die Fragestellung einer möglichen Beteiligung von Phosphatasen zu untersuchen, wurden kortikale Primärkulturen unter gleichzeitigem Einsatz von verschiedenen Phosphataseinhibitoren mit Ephrin-A5 stimuliert (Abb. 3.15). Es wurden der Serin-Threonin-Phosphataseinhibitor Okadainsäure, Natriumorthovanadat (ein Tyrosin-Phosphataseinhibitor) sowie der Pan-Phosphataseinhibitor PhosStop eingesetzt.

Wie schon Abb. 3.14 gezeigt, führte eine alleinige Stimulation mit Ephrin-A5 zu einer verminderten Phosphorylierung von ERK1/2 (Abb. 3.15A, siehe Quantifizierung in Abb. 3.15B). Eine gleichzeitige Applikation des Lenkungsmoleküls und der Phosphataseinhibitoren führte in allen Fällen zu einem Ausbleiben der Ephrin-A5-induzierten Unterdrückung der ERK-Aktivität (Abb. 3.15A, Quantifizierung in Abb. 3.15B).

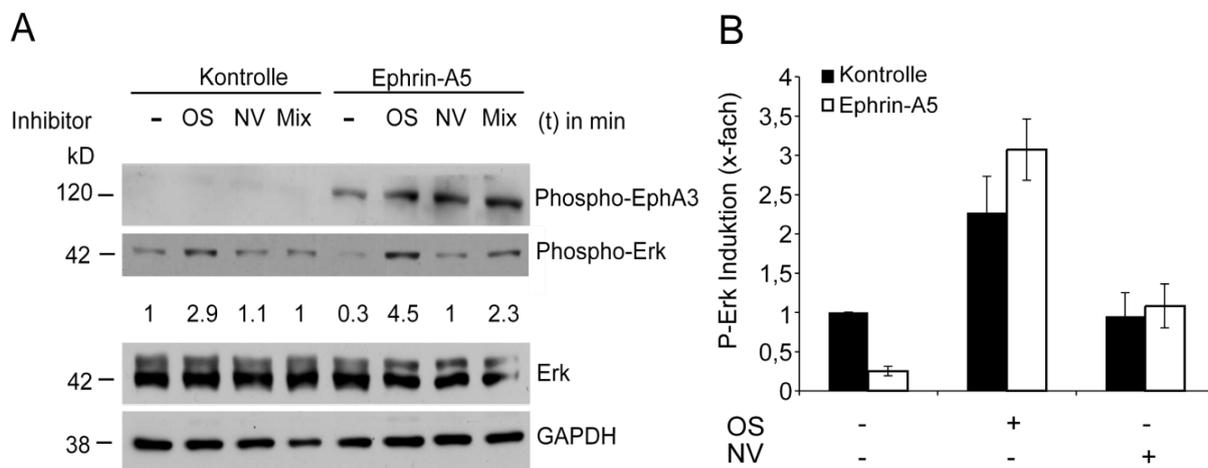


Abb. 3.15. Die Ephrin-A5 vermittelte Inhibition der ERK-Aktivität ist abhängig von Phosphatasen

E17,5 kortikale Neurone wurden 4 div kultiviert und anschließend 10 min mit den angegebenen Phosphataseinhibitoren vorinkubiert. Es folgte eine 30 minütige Ephrin-A5 Stimulation. Proteinlysate wurden hergestellt und 10 µg Protein in ein 10 %-iges Acrylamidgel geladen und die entsprechenden Proteine mittels Western Blot detektiert. Die Zahlen links des Blots geben die Markerbanden in kD an.

(A) Ephrin-A5 Applikation führt in kortikalen Neuronen zu einer Abnahme der P-ERK Menge. Dieser Effekt wird durch gleichzeitige Applikation von Phosphataseinhibitoren unterbunden.

(B) Quantifizierung von (A).

OV = Okadainsäure; NV = Natriumvanadat

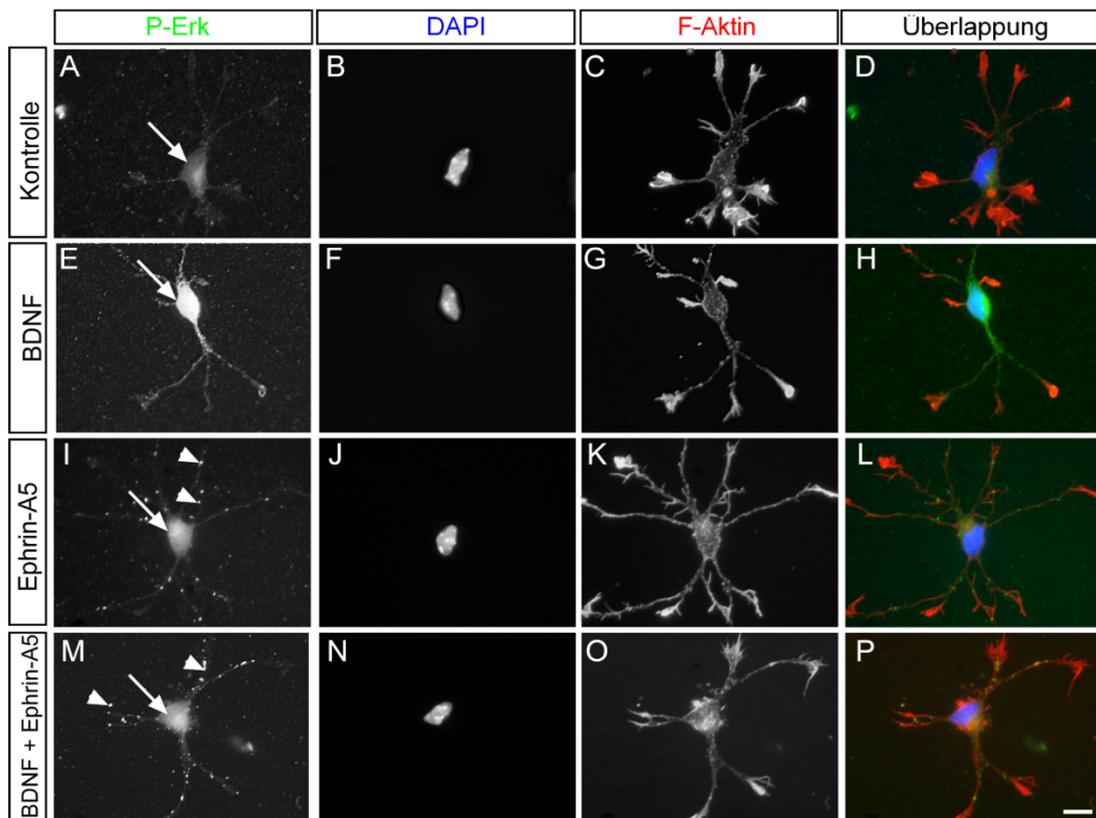
n = 3

3.2.8 EphA-Signalweiterleitung blockiert BDNF-induzierte P-ERK Translokation in den Zellkern

Es ist bekannt, dass ein nachfolgender Schritt der Phosphorylierung von ERK die Translokation in den Zellkern sein kann (Davis, 1995; Torii et al., 2004). Da in den vorangegangenen Experimenten erfolgreich gezeigt werden konnte, dass die Signalwege der aktivierten EphA- und TrkB-Rezeptoren auf der Ebene der MAPK interagieren (**Abb. 3.15**), galten folglich die nächsten Analysen der Untersuchung der P-ERK Translokation (**Abb. 3.16**).

Hierfür wurden hippocampale Kulturen wieder mit BDNF und/ oder Ephrin-A5-Fc für einen Zeitraum von 15 – 45 min stimuliert. Ebenso wie in vorangegangenen Publikationen (Wiegert et al., 2007) führt, verglichen mit der Kontrollsituation (**Abb. 3.16A- D**, siehe Quantifizierung in **Abb. 3.16Q**), eine Stimulation mit BDNF zu einer Erhöhung der Menge sowie zu einer Translokation von P-ERK in den Zellkern (**Abb. 3.16E- H**). Durch Applikation von Ephrin-A5 alleine unterblieb dieser Effekt (**Abb. 3.16I- L**), eine Änderung der P-ERK Menge und Translokation von P-ERK in den Zellkern war nicht zu verzeichnen. Jedoch konnte eine interessante Beobachtung gemacht werden. So bildeten sich stets nach Ephrin-A5 Stimulation punktförmige P-ERK Akkumulationen, vornehmlich in den Neuriten (siehe Pfeilspitzen in **Abb. 3.16I, M**). Auf diese Strukturen soll in dieser Arbeit zu einem späteren Zeitpunkt genauer eingegangen werden (**Abb. 3.18**). Nach EphA-Rezeptoraktivierung durch Ephrin-A5 wurde die BDNF-induzierte Erhöhung der Menge sowie Translokation von phosphoryliertem ERK in den Zellkern blockiert (**Abb. 3.16M- P**). Auch hier kam es wieder zur Ausbildung von P-ERK Akkumulationen .

Die Menge an Gesamt-ERK blieb unter allen Bedingungen unverändert (**Abb. 3.16R- U**).



Q

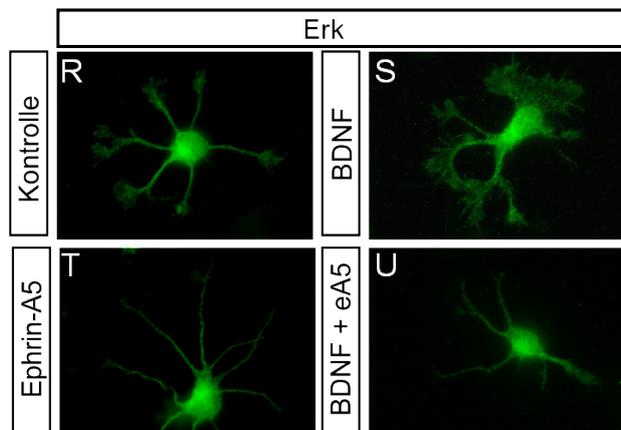
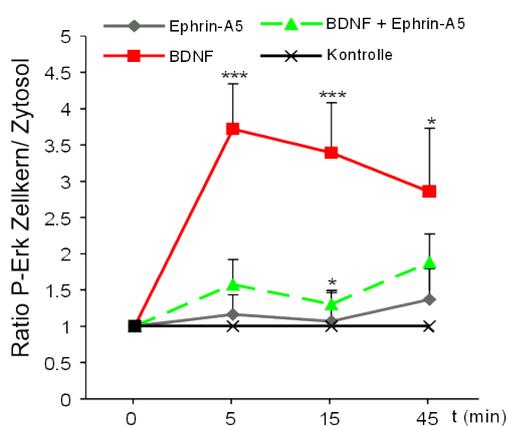


Abb. 3.16. EphA-Signaltransduktion verhindert Translokation von P-ERK in den Zellkern.

Hippocampale Kulturen wurden mit den angegebenen Applikationskombinationen für 15, 30 und 45 min inkubiert. Anschließend wurden F-Aktin (rot), DAPI (blau) und P-ERK (A– P) / ERK (R– U) (grün) angefärbt. Pfeile weisen auf die P-ERK Menge in den Zellkern hin, Pfeilspitzen auf P-ERK Akkumulationen in den Neuriten.

(A– D) Die Kontrollsituation zeigt geringe Mengen P-ERK im Zellkern und in den Neuriten (Grundmenge).

(E– H) Stimulation mit BDNF führt zu einem Anstieg an P-ERK und einer Anhäufung im und um den Zellkern.

(I– L) Stimulation mit Ephrin-A5 verändert die P-ERK Menge im Zellkern nicht. Jedoch sind punktförmige P-ERK Akkumulationen, vornehmlich in den Neuriten zu beobachten

(M– P) Simultane Stimulation mit BDNF und Ephrin-A5 führt zu einer Blockierung der BDNF-induzierten P-ERK Translokation in den Zellkern. Die Menge ist unverändert gegenüber der Kontrollsituation. Auch hier sind P-ERK Akkumulationen zu beobachten.

(Q) Quantifizierung von (A– P). Das Verhältnis von zytoplasmatischer zu nukleärer ERK-Intensität wurde bestimmt. Die ermittelten Werte für die Kontrolle wurden auf 1 gesetzt und diente als Bezug.

(R– U) Die Gesamt-ERK Menge unter allen Bedingungen gleich.

Maßstab (A– P, R– U) = 10 µm

3.2.8.1 Die EphA-vermittelte Hemmung der Neurotrophin-induzierten P-ERK Translokation in den Zellkern geschieht unabhängig von SRF

Die Abbildungen in **Abb. 3.16** zeigen Daten von hippocampalen Wildtyp-Neuronen. Um eine mögliche Beteiligung des *Serum Response Factors* an der EphrinA5-vermittelten Hemmung der BDNF-induzierten P-ERK Translokation in den Zellkern zu untersuchen, wurde das in 3.2.8 beschriebene Experiment auch mit SRF-defizienten Neuronen durchgeführt (**Abb. 3.78**). Es ist zu erkennen, dass es schon kurz nach BDNF-Stimulation, ebenfalls wie in Wildtyp-Neuronen (**Abb. 3.16Q**), zu einer robusten Induktion der P-ERK Menge im Zellkern kommt (**Abb. 3.17**). Eine alleinige Stimulation mit Ephrin-A5 zeigt auch hier keinen Effekt. Wie in *Srf*^(+/+)-Neuronen wird durch gleichzeitige Applikation mit Ephrin-A5 die BDNF-induzierte Translokation von P-ERK blockiert. Jedoch ist festzustellen, dass die BDNF-induzierte Translokation über einen geringeren Zeitraum erfolgt als in Wildtyp-Kulturen. Hierbei wird das Maximum nach 5 Minuten erreicht und fällt bereits nach 45 min rapide ab (**Abb. 3.17**). In wildtypischen Zellen hingegen hält die Translokation und Akkumulation von P-ERK in und um den Zellkern für 45 min an (**Abb. 3.16Q**). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass SRF für die Ephrin-A5 vermittelte Inhibierung der BDNF-induzierten Translokation von P-ERK in den Zellkern nicht essentiell ist, jedoch die Wirkungsdauer des Neurotrophins beeinflusst.

Die punktförmige P-ERK Akkumulation in *Srf*-deletierten hippocampalen Neuronen wird ebenfalls nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt), folglich scheint auch dieser Prozess SRF-unabhängig zu sein.

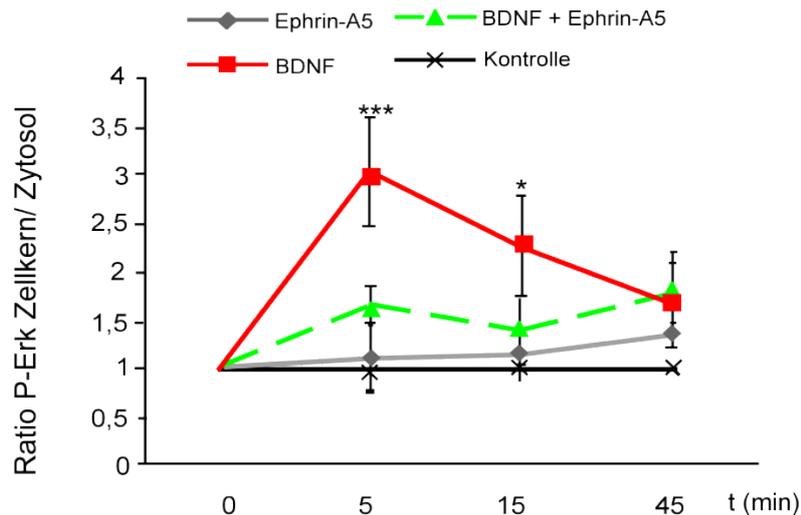


Abb. 3.17. Translokation von P-ERK in den Zellkern ist nicht abhängig von SRF.

Hippocampale *Srf*-deletierte Neurone wurden mit BDNF und/ oder Ephrin-A5 für die indizierten Zeiträume stimuliert und das Verhältnis von zytoplasmatischer zu nukleärer ERK-Intensität wurde bestimmt. Die ermittelten Werte für die Kontrolle wurden auf 1 gesetzt und diente als Bezug.

Die BDNF-induzierte P-ERK Translokation wird durch Ephrin-A5 blockiert. Die Dauer der BDNF-induzierten Akkumulation von P-ERK in und um den Zellkern ist in SRF-defizienten Neuronen hingegen verkürzt.

3.2.9 P-ERK Signale kolokalisieren mit EphA-Rezeptoren

Im Weiteren galt es den interessanten Sachverhalt der durch Ephrin-A5 induzierten punktförmigen P-ERK Akkumulation genauer zu untersuchen. Hierzu wurde eine Kolokalisationsstudie für den EphA-Rezeptor durchgeführt (Abb. 3.18). Bei diesem kommt es nach Ligandenbindung zu einer Aktivierung mit folglich Heterodimerisierung weiterer EphA-Rezeptoren. In immunzytochemischen Färbungen ist dies als punktförmige Anhäufung zu erkennen. Neben der Rezeptor-Heterodimerisierung kann jedoch auch die endozytotische Rezeptorinternalisierung zum Clustererscheinungsbild führen (Pitulescu and Adams, 2010; Zimmer et al., 2003). Kürzlich veröffentlichte Daten lassen darauf schließen, dass eine endozytotische Eph-Rezeptorinternalisierung für eine korrekte Signalpropagation und damit einhergehende adäquate Entwicklung des Nervensystems notwendig ist (Pitulescu and Adams, 2010; Yoo et al., 2011).

Zur Untersuchung des Sachverhaltes wurden hippocampale Neurone für 15 min stimuliert (die Akkumulationsstrukturen treten bereits nach 5 minütiger Stimulation in Erscheinung) und die angegebenen Moleküle mittels immunzytochemischer Färbungen sichtbar gemacht. Wie Abb. 3.18 zeigt, führt eine Ligandenbindung zu

einer Ko-Lokalisierung der P-ERK Akkumulationen mit den EphA-Rezeptoren. Unter unstimulierten Bedingungen war keine Kolokalisation zu beobachten (Daten nicht gezeigt)

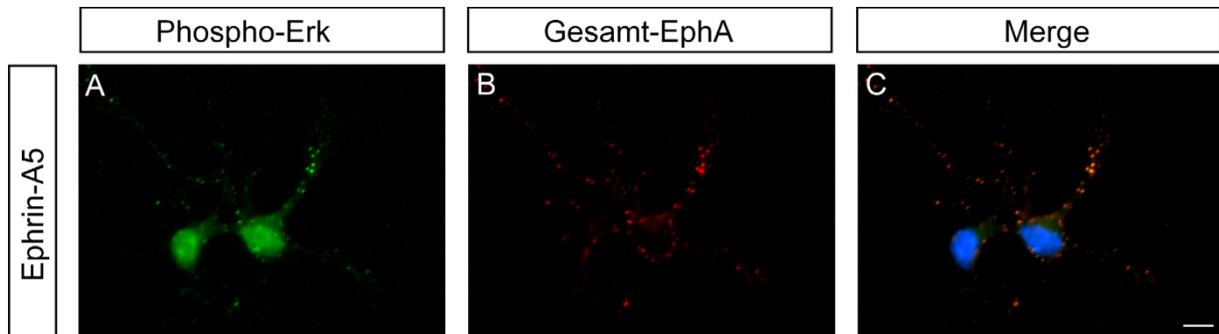


Abb. 3.18. P-ERK Akkumulationsstrukturen ko-lokalisieren mit EphA-Rezeptoren.

(A) Ephrin-A5 Applikation führt zu einer punktförmigen P-ERK Akkumulation.
 (B) Ligandenbindung führt zu einer EphA-Rezeptoraktivierung gekennzeichnet durch die EphA-Cluster.
 (C) P-ERK Akkumulationsstrukturen ko-lokalisieren mit EphA-Rezeptoren, gekennzeichnet durch gelbe Färbungen.
 Maßstab = 10 μ m

3.2.10 Kolokalisation des EphA-Rezeptors mit Ras-GAP

Die Akkumulation von P-ERK zu punktförmigen Strukturen kann einen Hinweis zum Wirkmechanismus von Ephrin-A5 auf die Inhibierung des MAPK-Signalweges geben. Deshalb wurde im nächsten Schritt untersucht, ob es durch Ephrin-A5 zu einer Rekrutierung von Signalmolekülen kommt, die in Betracht kommen in diesem Prozess involviert zu sein. Als möglicher Kandidat gilt das GTPase-aktivierende Protein Ras-GAP (siehe 1.1.2.2), ein Downstreameffektor des EphA-Rezeptors, welcher in Zusammenhang mit der Inhibierung des MAPK-Weges gebracht wurde (Elowe et al., 2001; Tong et al., 2003). Hierbei konnte gezeigt werden, dass in NG108 neuronalen Zellen eine Stimulation mit Ephrin-B zu einer Hemmung der MAP-Kinasen ERK1/2 durch Aktivierung des p120 Ras-GAP führt. Unter Verwendung einer trunkierten, und damit funktionsunfähigen Form des p120-Ras GTPase-aktivierende Proteins (p120 Ras-GAP) unterblieb die Ephrin-B induzierte Hemmung von ERK1/2. Aus diesen Daten konnte geschlussfolgert werden, dass es durch EphB-Rezeptoraktivierung zu einer Rekrutierung und Aktivierung von p120 Ras-GAP

kommt, welches wiederum Ras inaktiviert. Diese Ras-Inaktivierung resultiert schließlich in einer Hemmung von ERK1/2.

Der Versuchsaufbau für dieses Experiment ist analog zu dem in 3.2.8 beschriebenen. In hippocampalen Neuronen wird ersichtlich, dass eine Stimulation mit BDNF, verglichen mit der Kontrollbedingung (**Abb. 3.19A- C**), zu keiner Ko-lokalisierung mit EphA-Rezeptoren führt (siehe **Abb. 3.19D- F**). Eine EphA-Rezeptoraktivierung durch Ephrin-A5 (**Abb. 3.19G- L**) hingegen führte bei Ras-GAP interessanter Weise, analog zu P-ERK, ebenso zu einer Clusterbildung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Ephrin-A5 die BDNF-vermittelte Translokation von P-ERK in den Zellkern blockiert. Des Weiteren kommt es durch Ephrin-A5 zu einer Ausbildung von P-ERK Clustern, welche sowohl mit EphA-Rezeptoren wie auch Ras-GAP ko-lokalisieren.

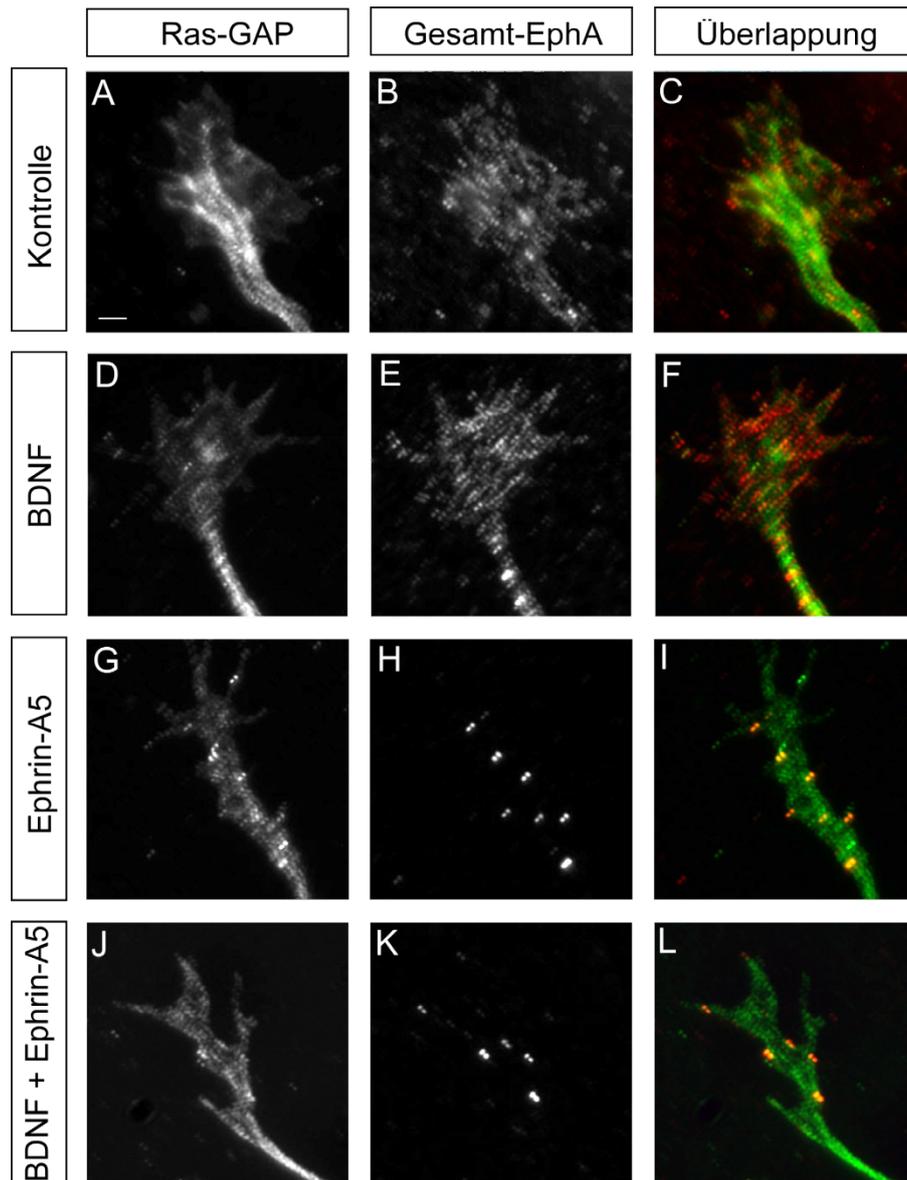


Abb. 3.19. Ras-GAP Cluster kolokalisieren mit EphA-Rezeptoren

Hippocampale Neurone wurden für 15 min mit den Lenkungsmolekülen wie angezeigt stimuliert. Anschließend wurden Ras-GAP (grün) und EphA-Rezeptoren (rot) angefärbt. Kolokalisation ist durch gelbe, punktförmige Akkumulationen gekennzeichnet.

(A- F) In der Kontrollsituation sowie nach alleiniger BDNF Applikation sind nur wenige Ras-GAP Cluster erkennbar (A, D). Eine Kolokalisation mit EphA-Rezeptoren erfolgte nicht (C, F).

(G- L) Ephrin-A5 Applikation führt zu einer Ras-GAP Clusterbildung, so auch bei simultaner BDNF Stimulation (G, J). Die Ras-GAP Cluster kolokalisieren mit aktivierten EphA-Rezeptoren (I, L).

Maßstab = 2 µm

3.2.11 Die vorwärts gerichtete EphA-Signaltransduktion beeinflusst die BDNF-induzierte transiente Genexpression von IEGs

Das in den Zellkern translozierte P-ERK kann nun seinerseits verschiedene Transkriptionsfaktoren aktivieren, u.a. auch SRF und CREB (*cAMP responsive element binding protein*), welche wiederum die Genexpression entsprechender Zielproteine beeinflussen (Brunet et al., 1999; Finkbeiner et al., 1997; Knoll and Nordheim, 2009). Da die P-ERK Translokation in den Zellkern durch die Aktivierung der EphA-Signaltransduktion beeinflusst wird (siehe **Abb. 3.16**), sollte in einem nächsten Experiment geklärt werden, ob Ephrin-A5 einen möglichen Einfluss auf die BDNF-vermittelte Genexpression hat (**Abb. 3.20**). Es sollte zudem festgestellt werden, ob dieser Prozess abhängig ist von der Aktivierung des Transkriptionsfaktors SRF. Hierfür wurden wildtypische und SRF-defiziente kortikale Primärkulturen für 20 min mit BDNF, Ephrin-A5 oder beiden Substanzen gleichzeitig stimuliert. Anschließend wurde die mRNA Menge von frühen unmittelbaren Genen (IEGs, *immediate early genes*, **Abb. 3.20B- E**) und zytoskelettalen Genen (**Abb. 3.20F- L**) mit Hilfe quantitativer RT-PCR ermittelt. Die untersuchten Gene stellen hierbei SRF-Zielgene dar (Knoll and Nordheim, 2009; Miano et al., 2007).

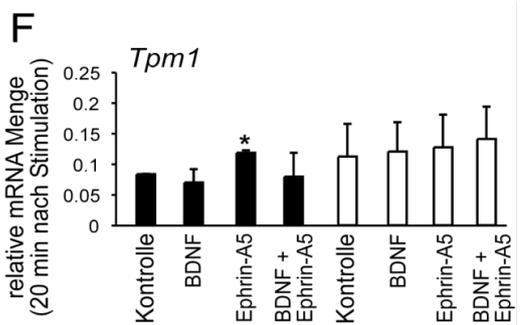
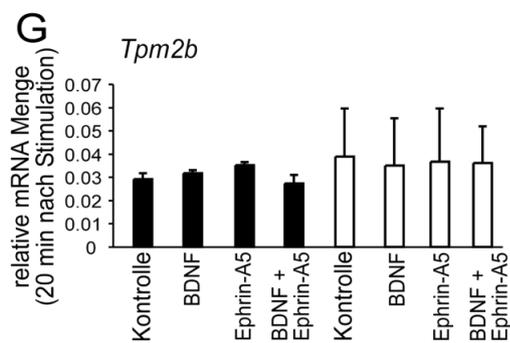
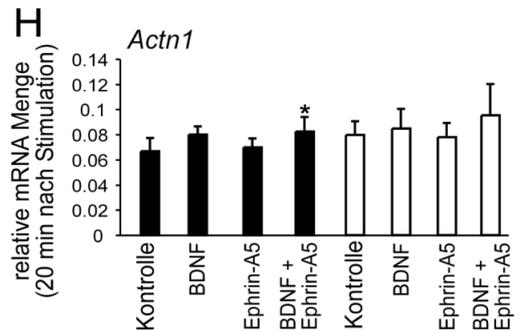
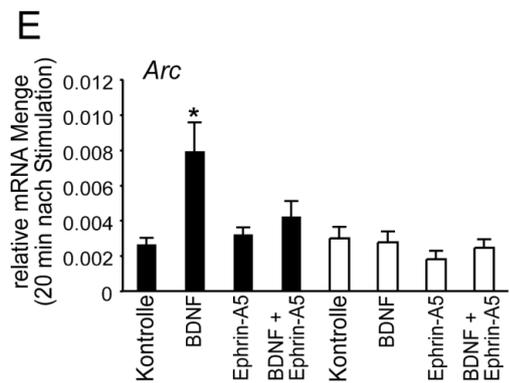
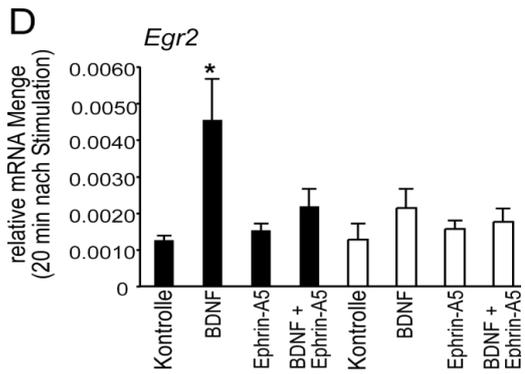
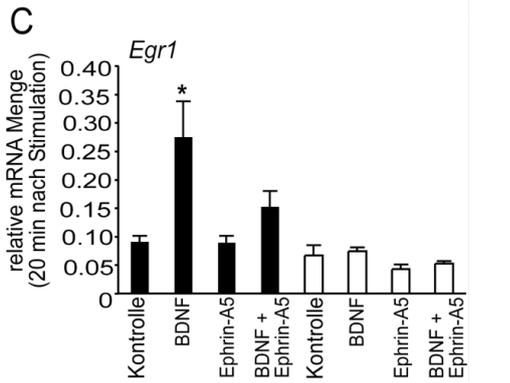
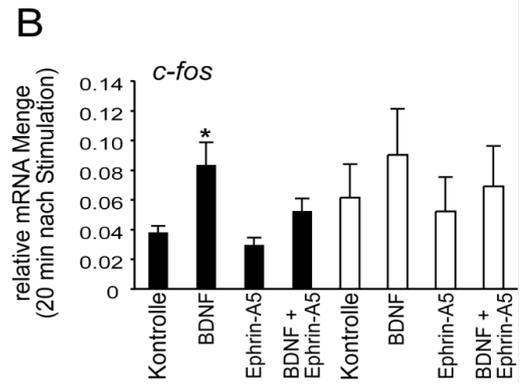
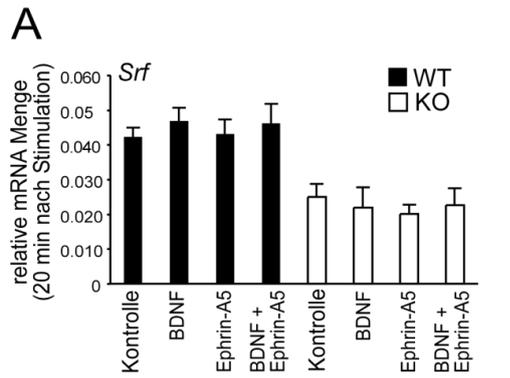
In wildtypischen kortikalen Neuronen führte eine Stimulation mit BDNF zu einer starken Induktion der IEGs *c-fos* (**Abb. 3.20B**), *Egr1* (**Abb. 3.20C**), *Egr2* (**Abb. 3.20D**) und *Arc* (**Abb. 3.20E**). Die *Srf*-Menge blieb hingegen unbeeinflusst von BDNF (**Abb. 3.20A**). Andere Untersuchungen auf Proteinebene zeigten jedoch, dass eine Stimulation kortikaler Neurone mit BDNF zu einer Erhöhung der SRF-Proteinmenge führt (Kalita et al., 2006). Hierbei ist jedoch anzumerken, dass der experimentelle Aufbau eine langanhaltende Stimulation (4 bis 8h) vorsah. Die alleinige Applikation von Ephrin-A5 zeigte keinen Effekt auf die wildtypischen Neurone, die mRNA Menge der IEGs blieb unverändert (**Abb. 3.20A- E**). Nach simultaner Stimulation mit BDNF und Ephrin-A5 kommt es nun interessanter Weise zu einer Inhibierung der BDNF-induzierten Genexpression der untersuchten IEGs *c-fos*, *Egr1*, *Egr2* und *Arc* (**Abb. 3.21B- E**). Gleiche Ergebnisse konnten auch unter der Verwendung hippocampaler Primärkulturen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Bei den zytoskelettalen Genen sind keine robusten Veränderungen in der Expressionsmenge der untersuchten Gene erkennbar (**Abb. 3.20F -K**), was dadurch

begründet sein kann, dass die Gesamtexpressionsmenge um ein Wesentliches höher liegt als bei den IEGs und eine Induktion somit schwieriger zu erreichen ist. So ist lediglich bei dem F-Aktin stabilisierenden *Tpm1* (Tropomyosin 1, **Abb. 3.20F**) ein Anstieg nach Ephrin-A5 Applikation und bei dem F-Aktin-Linkerprotein alpha-Actinin1 (*Actn1*, **Abb. 3.20H**) nach BDNF und Ephrin-A5 Applikation zu verzeichnen. Tendenziell, jedoch nicht signifikant, ist eine Induktion des Filamin-alpha Gens (*Flna*, **Abb. 3.20K**) durch BDNF und/oder Ephrin-A5 erkennbar. Alle weiteren untersuchten zytoskelettalen Gene blieben durch eine 20 minütige Stimulation unbeeinflusst (**Abb. 3.20G, I, J**).

Die Inhibierung der Neurotrophin-induzierten Genexpression durch vorwärts gerichtete EphA-Signalweiterleitung erfolgt für die IEGs *Egr1*, *Egr2* und *Arc* in Abhängigkeit von SRF. Verdeutlicht wird dies durch das Ausbleiben einer Genexpression in *Srf*-deletierten Neuronen (**Abb. 3.20A, C-K**). Das *immediate early gene c-fos* scheint hierbei eine Ausnahme darzustellen, da auch hier trotz *Srf*-Deletion eine Induktion des Gens erfolgen kann (**Abb. 3.20B**). SRF wird damit offensichtlich nicht für die EphA-vermittelte Hemmung der BDNF-induzierten Inhibierung von *c-fos* benötigt.

Neben den unmittelbar frühen und zytoskelettalen Genen wurde ein weiteres Gen untersucht, namentlich die zellkernspezifische dual-spezifische Phosphatase *Dusp5* (**Abb. 3.20L**), da diese maßgeblich an der Inaktivierung der MAP-Kinase ERK beteiligt ist (Kucharska et al., 2009). Wie in **Abb. 3.15** gezeigt, ist die Inhibierung des MAPK-Signalweges unter anderem abhängig von Phosphatasen, weshalb *Dusp5* für die Genexpressionanalysen gewählt wurde. Hierbei ist zu erkennen, dass sowohl durch BDNF als auch Ephrin-A5 die Menge des exprimierten Gens stark ansteigt. Eine Abhängigkeit von SRF liegt hierbei nicht vor, da in *Srf*-deletierten Neuronen die Induktion des Gens erfolgt. Inwiefern das die EphA-induzierte Hemmung von ERK beeinflusst, wird in 4.1.3. näher diskutiert.



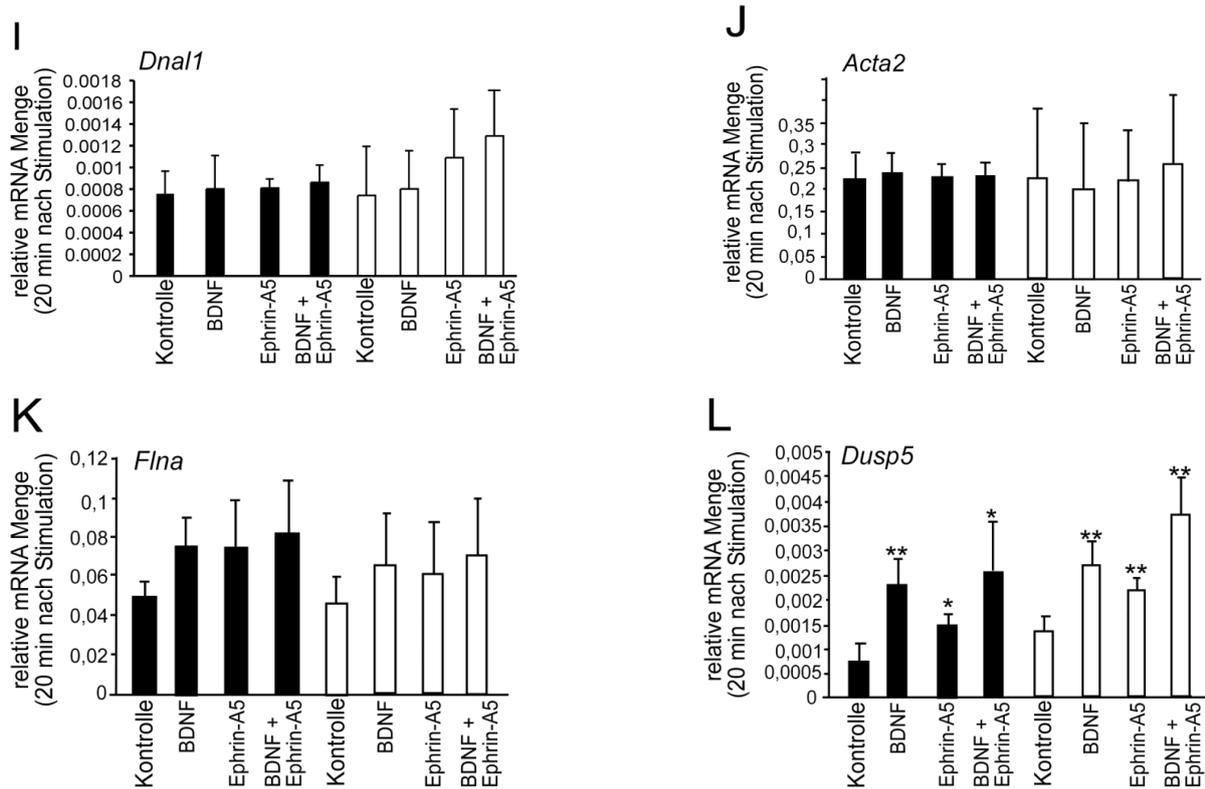


Abb. 3.20. Ephrin-A5 moduliert die kurzzeitige BDNF-induzierte Genexpression.

Kortikale Neurone wurden mit BDNF und/ oder Ephrin-A5 für 20 min stimuliert und anschließend mRNA Mengen mittels qRT-PCR bestimmt. Als Referenzgen wurde *Gapdh* verwendet. Schwarze Balken indizieren Wildtyp-Neurone, weiße Balken SRF-defiziente.

(A) Die *Srf*-Genexpression wird durch keinen Stimulus beeinflusst, jedoch ist wie erwartet die Menge in *Srf*-deletierten Zellen nur halb so hoch wie in wildtypischen Neuronen

(B- E) BDNF induziert robust die Genexpression der IEGs *c-fos*, *Egr1*, *Egr2* und *Arc*. Durch Ephrin-A5 kommt es zu einer Inhibierung der Neurotrophin-vermittelten Genexpression. Dieser Effekt ist abhängig von SRF, da in SRF-defizienten Neuronen die BDNF-vermittelte Induktion unterbleibt.

(F- K) Die Expression zytoskelettaler Gene wird kaum beeinflusst. Bei *Tpm1* ist durch Ephrin-A5 ein leichter Anstieg der Genexpressionsmenge zu verzeichnen, sowie bei *Actn1* unter simultaner BDNF/Ephrin-A5 Stimulation.

(L) Die Expression der Phosphatase *Dusp5* wird durch BDNF und Ephrin beeinflusst. Es erfolgt eine robuste Induktion. In SRF-defizienten Neuronen kommt es ebenso zu einer Induktion, was auf einen SRF-unabhängigen Prozess schließen lässt.

*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001. Fehlerbalken repräsentieren die SA.

n = 5

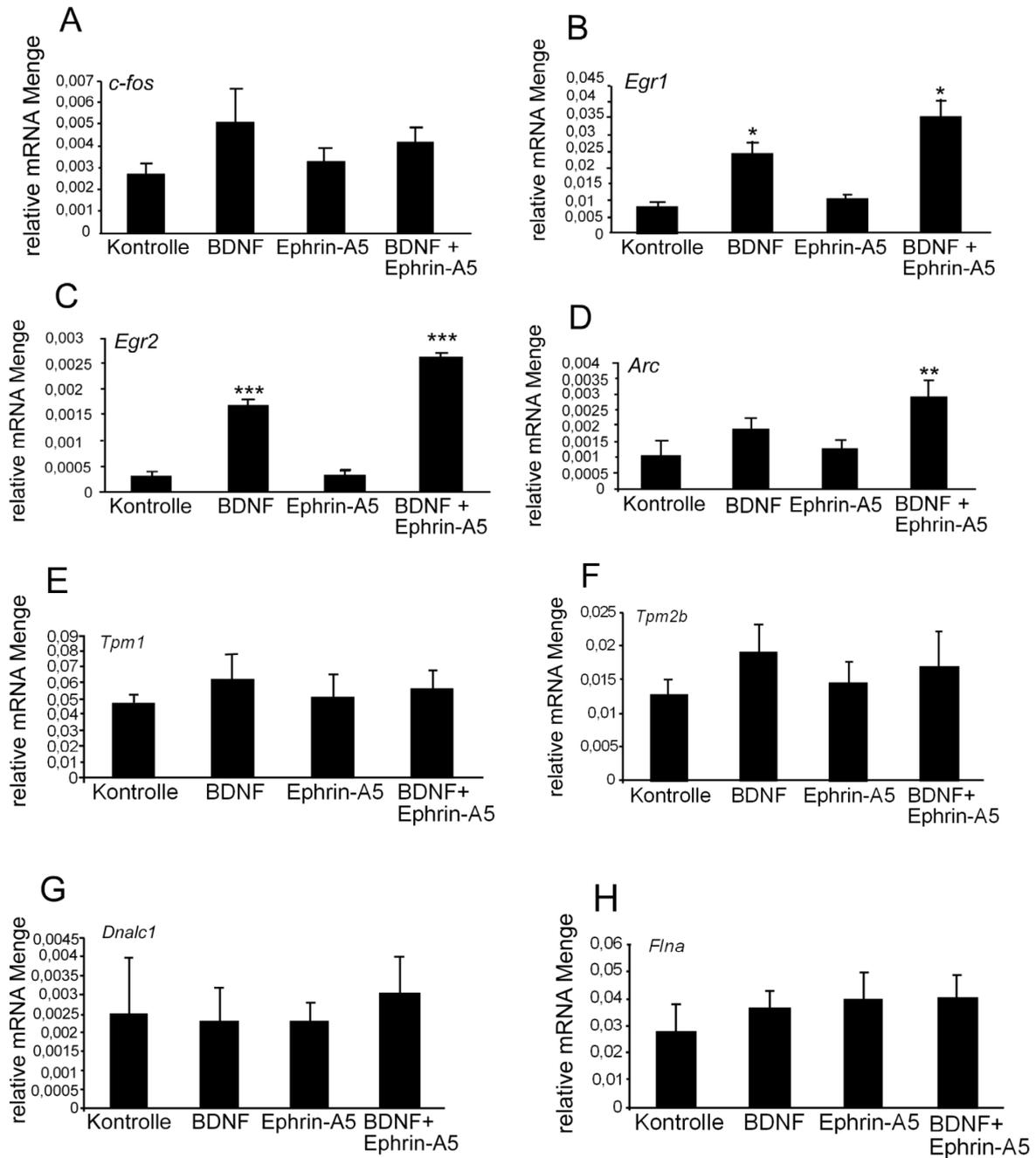
3.2.12 Die langandauernde vorwärts gerichtete EphA-Signaltransduktion beeinflusst die Genexpression zytoskelettaler Gene

Die Inhibierung der Neurotrophin-vermittelten Induktion der IEGs durch EphA-Rezeptoraktivierung erfolgte robust und schnell (Abb. 3.20). Dies ist nicht verwundernd, erfolgt die IEG-Induktion doch innerhalb weniger Minuten nach Stimulation (Greenberg and Ziff, 1984; Knoll and Nordheim, 2009). Eine Induktion zytoskelettaler Gene war kaum zu beobachten (Abb. 3.20). Es galt nun den Effekt auf die Genexpression einer langandauernden Stimulation mit den Lenkungsmolekülen zu untersuchen (Abb. 3.21 und Abb. 3.22). Hierfür wurden kortikale Neurone für einen Zeitraum von 4h (Abb. 3.21) und 16 h (Abb. 3.22) stimuliert und anschließend erneut die mRNA Menge mittels qRT-PCR bestimmt.

Betrachtet man die IEGs *Egr1*, *Egr2* und *Arc*, so ist in Abb. 3.21 und Abb. 3.22 ersichtlich, dass eine langanhaltende Stimulation mit Ephrin-A5 zu keiner Inhibierung der BDNF-vermittelten Genexpression führt, sondern vielmehr den BDNF-Effekt verstärkt (Abb. 3.21B-D, Abb. 3.22B, D). Besonders deutlich ist das bei *Egr2* und *Arc* (Abb. 3.21B, C) zu erkennen. Die Expression von *Dusp5* erhöht sich nach 4-stündiger simultaner BDNF und Ephrin-A5 Stimulation signifikant (Abb. 3.21I). Nach 16h ist dieser Effekt nicht mehr sichtbar (Abb. 3.22I). Die mRNA Menge des PlexinA3-Rezeptors (*Plxna3*), ein Rezeptor für das axonale Lenkungsmolekül Semaphorin, zeigt bei beiden Stimulationszeitpunkten keine Veränderung (Abb. 3.21J, Abb. 3.22M). Während eine 4-stündige Stimulation noch keinen Einfluss auf die Expression zytoskelettaler Gene zeigt (Abb. 3.21E-H, K, L), ist bei einem Stimulationszeitraum über 16h ein Anstieg solcher zu beobachten (Abb. 3.22F, G, H). So kommt es durch EphA-Rezeptoraktivierung zu einer erhöhten Expression des F-Aktin stabilisierenden Tropomyosin2 (Abb. 3.22F). Eine ebenfalls signifikante Erhöhung des Genexpressionslevels ist bei *Actn1* sowohl nach BDNF als auch Ephrin-A5 Stimulation zu erkennen (Abb. 3.22G). Des Weiteren führt eine Applikation mit Ephrin-A5 zu einer gesteigerten mRNA Menge des Motorproteins *Dnalc1* (*dynein, axonemal light chain 1*).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine langandauernde EphA-Rezeptoraktivierung eher in einer Potenzierung der Neurotrophin-vermittelten Genexpression der IEGs resultiert und nicht zu einer Inhibierung wie nach kurzer

Stimulation. Auch die Genexpression zytoskelettaler Gene wird durch Langzeitapplikation von Ephrin-A5 moduliert.



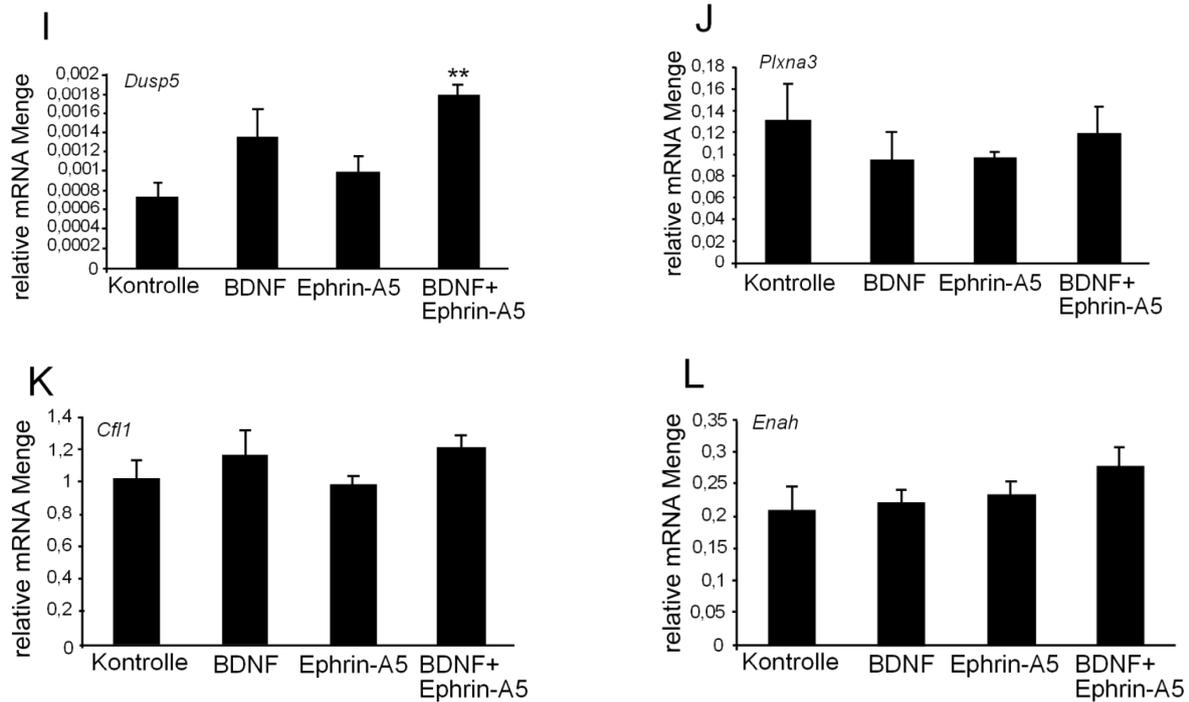


Abb. 3.21. 4-stündige EphA-Rezeptoraktivierung führt zu einer Beeinflussung von IEGs aber nicht von zytoskelettalen Genen.

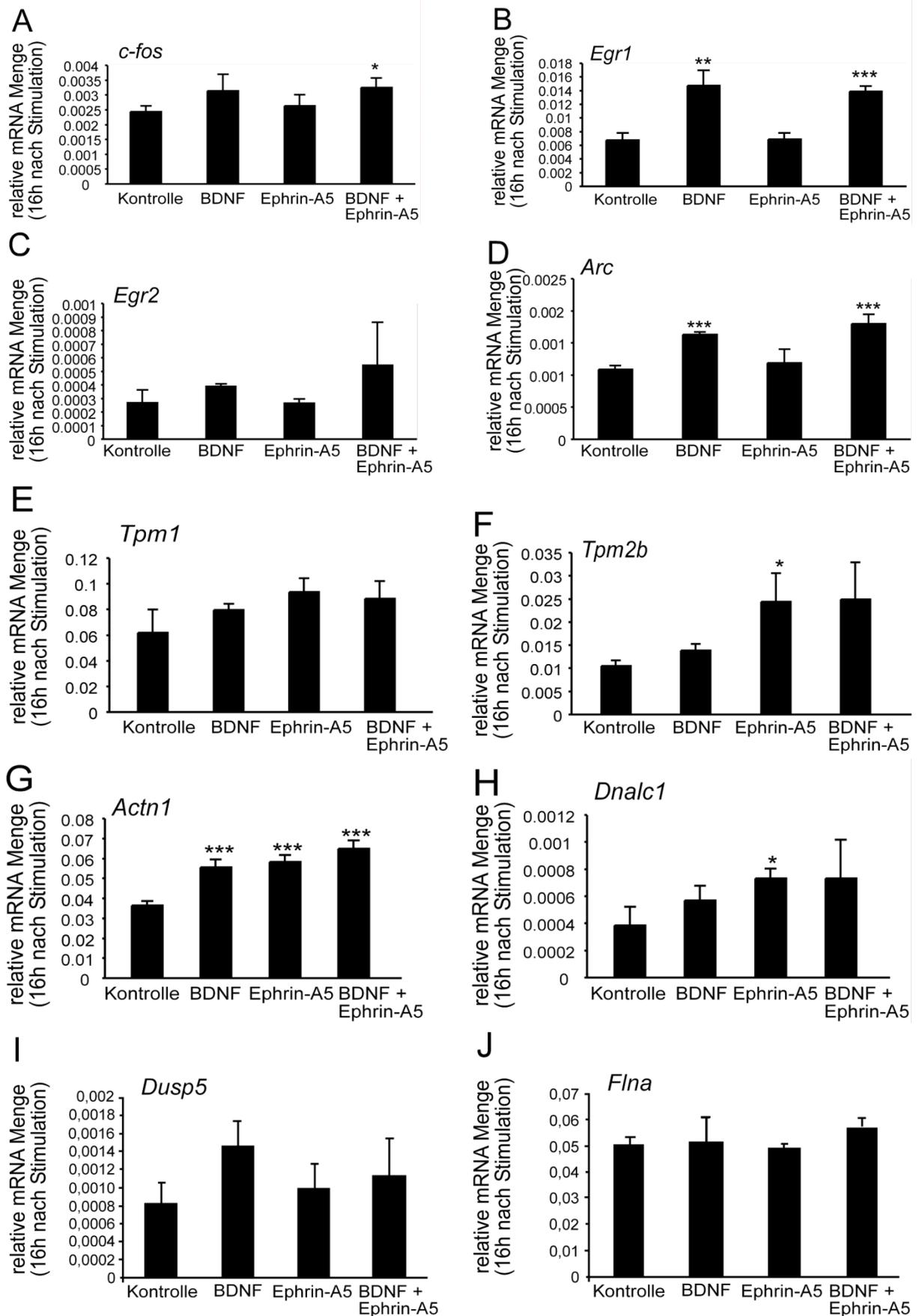
Kortikale Neurone wurden mit BDNF und/ oder Ephrin-A5 für 4h stimuliert und anschließend mRNA Mengen mittels qRT-PCR bestimmt. Als Referenzgen wurde *Gapdh* verwendet. Balken indizieren Wildtyp-Neurone.

(A- D) Effekt einer langandauernde Ephrin-A5 Stimulation auf die IEGs *c-fos*, *Egr1*, *Egr2*, *Arc*. EphA-Rezeptoraktivierung führt zu einer Potenzierung der BDNF-vermittelten Genexpression der IEGs *Egr1* (B), *Egr2* (C) und *Arc* (D).

(E- L) Bei einer 4-stündigen Applikationsdauer hat Ephrin-A5 keinen Einfluss auf die Genexpression zytoskelettaler Gene. (E- H, K, L) und den Semaphorinrezeptor *PlxnA3* (I). Die mRNA Menge der Phosphatase *Dusp5* steigt nach simultaner Stimulation mit BDNF und Ephrin-A5.

*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$. Fehlerbalken repräsentieren die SA.

n = 4



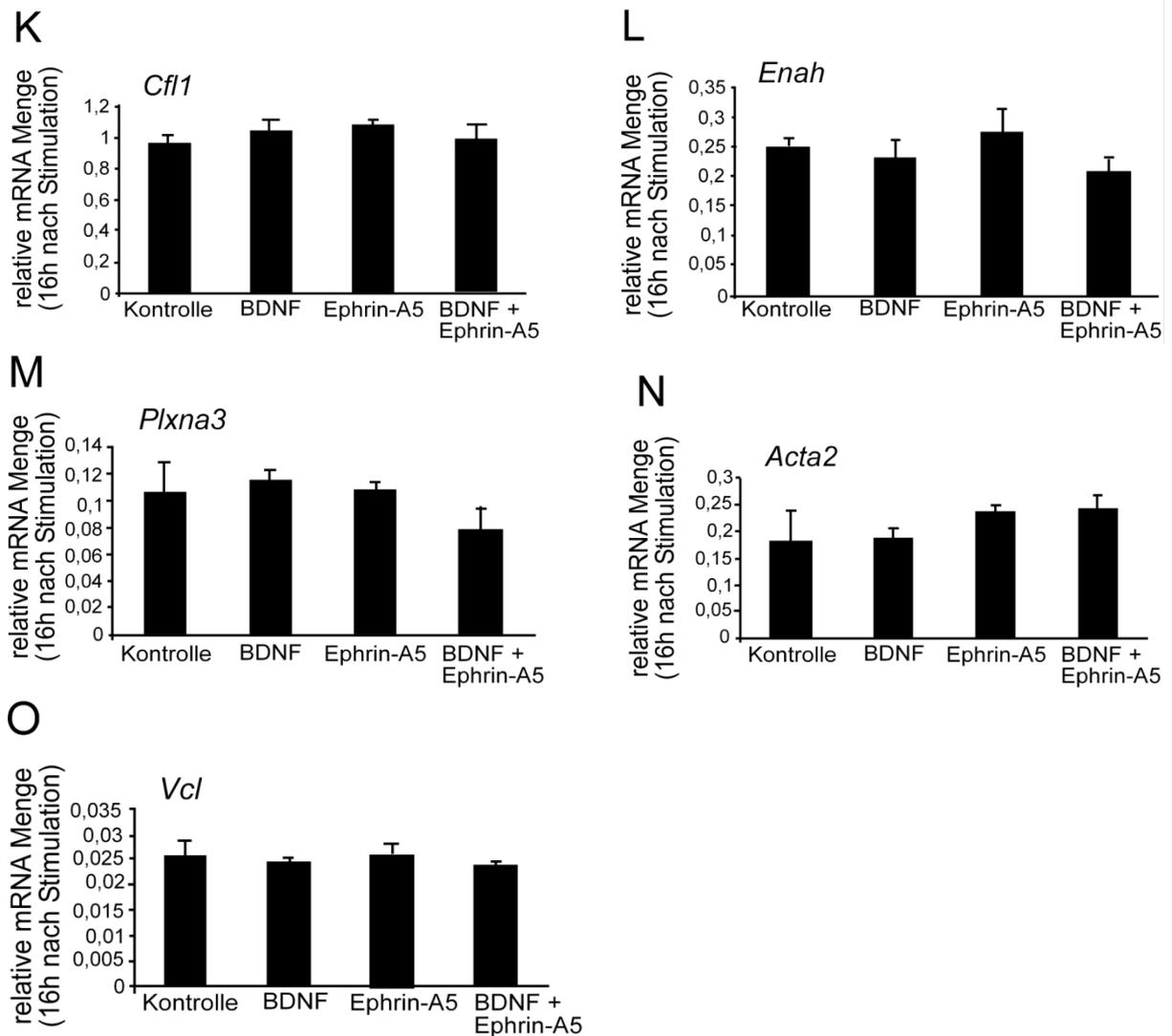


Abb. 3.22. 16-stündige EphA-Rezeptoraktivierung führt zu einer Beeinflussung von IEGs und von zytoskelettalen Genen

Kortikale Neurone wurden mit BDNF und/ oder Ephrin-A5 für 16h stimuliert und anschließend mRNA Mengen mittels qRT-PCR bestimmt. Als Referenzgen wurde *Gapdh* verwendet. Balken indizieren Wildtyp-Neurone.

(A- D) Effekt einer langandauernde Ephrin-A5 Stimulation auf die IEGs *c-fos*, *Egr1*, *Egr2*, *Arc*. EphA-Rezeptoraktivierung führt zu einer Potenzierung der BDNF-vermittelten Genexpression der IEGs *Egr1* (B) und *Arc* (D).

(E- O) Bei einer 16-stündigen Applikationsdauer beeinflusst Ephrin-A5 die Genexpression zytoskelettaler Gene. (F, G, H).

*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001. Fehlerbalken repräsentieren die SA.

n = 4

3.2.13 Inhibierung der BDNF-vermittelten Genexpression ist spezifisch für die EphA-Rezeptoraktivierung

Im Folgenden galt es zu überprüfen, ob die Inhibierung der Neurotrophin-vermittelten Genexpression der IEGs *c-fos*, *Egr1*, *Egr2* und *Arc* ein allgemeiner Effekt mehrerer repulsiv agierender Lenkungsmoleküle ist. Zu diesem Zweck wurde Semaphorin 3A ausgewählt, da es ebenfalls wie Ephrin-A5 einen repulsiven Effekt auf den Wachstumskegelkollaps hat und u.a. zu einem Wachstumskegelkollaps führt (Knoll et al., 2006; Nakamura et al., 2000). Dafür wurden kortikale Neurone für 20 min mit Semaphorin 3A stimuliert (siehe 2.2.1.4) und mRNA Mengen mittels qRT-PCR bestimmt (Abb. 3.23)

Im Gegensatz zu Ephrin-A5 (Abb. 3.20) antagonisiert Semaphorin 3A die BDNF-induzierte Genexpression der IEGs nicht (Abb. 3.23A-D). Daraus lässt sich schließen, dass der gezeigte Effekt spezifisch für die EphA-Rezeptoraktivierung ist.

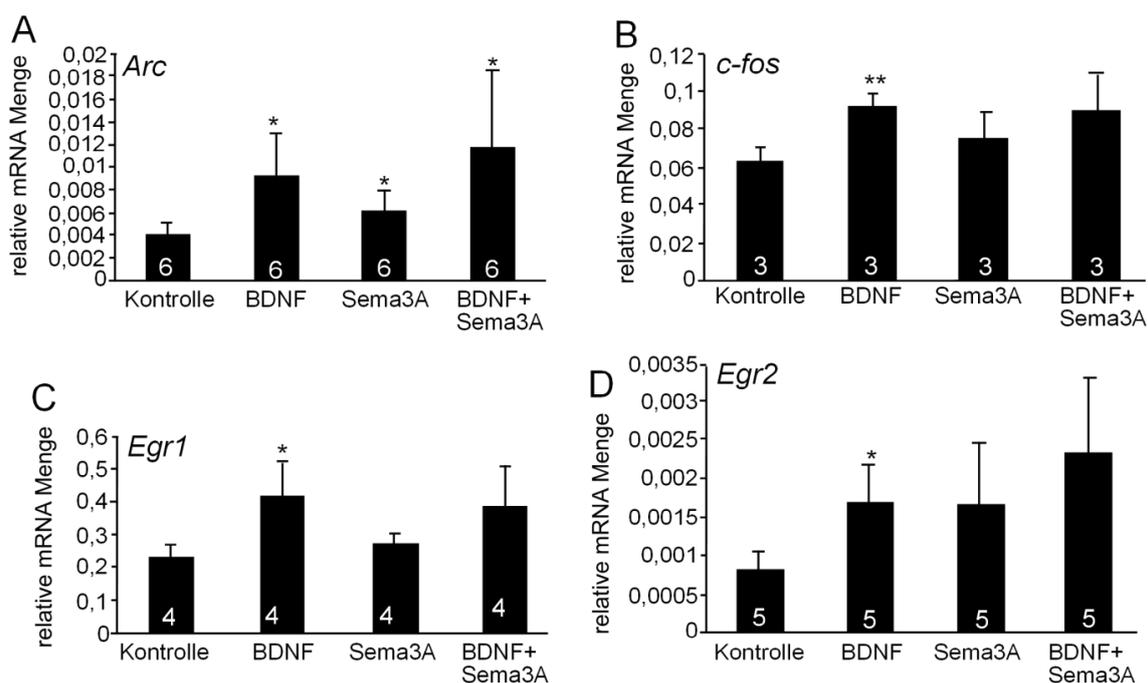


Abb. 3.23. Inhibierung der BDNF-vermittelten Genexpression ist spezifisch für die EphA-Rezeptoraktivierung.

Kortikale Neurone wurden mit BDNF und/ oder Semaphorin 3A für 20 min stimuliert und anschließend die mRNA Menge mittels qRT-PCR bestimmt. Als Referenzgen wurde *Gapdh* verwendet. Zahlen in den Balken spiegeln die Anzahl der unabhängigen Experimente wider.

(A-D) Semaphorin inhibiert nicht die BDNF-induzierte Genexpression der IEGs
 *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001. Fehlerbalken repräsentieren die SA.

3.2.14 MAPK sind in die EphA-vermittelte Inhibierung der BDNF-induzierten Genexpression partiell beteiligt

Die bisherigen Daten zeigen eine Beteiligung von MAP-Kinasen an der EphA-vermittelten Inhibierung der BDNF-induzierten Stimulation (Abb. 3.14 und Abb. 3.16). Um zu überprüfen ob dies auch für die Inhibierung der transienten BDNF-induzierten Genexpression der IEGs *c-fos*, *Egr1*, *Egr2* und *Arc* gilt, wurden kortikale Neurone mit einem konstitutiv aktiven MEK1 Konstrukt (CA-MEK1) transfiziert, anschließend mit BDNF und/ oder Ephrin-A5 stimuliert und mRNA Expressionsmengen mittels qRT-PCR bestimmt (Abb. 3.24). Erfolgt die Inhibierung der BDNF-induzierten Genexpression durch Ephrin-A5 unter Beteiligung des MAPK-Signalweges, so ist durch die Verwendung eines konstitutiv aktiven MEK1 Konstrukts zu erwarten, dass Ephrin-A5 die Neurotrophin-induzierte Genexpression der IEGs nicht mehr inhibieren kann.

In Kontroll-elektroporierten (Mock) Neuronen vermindert die EphA-Signaltransduktion eine BDNF-induzierte Genexpression, so wie auch schon in den vorangegangenen Experimenten gezeigt (Abb. 3.20). Werden die Neurone mit dem CA-MEK1 Konstrukt elektroporiert, wird dieser Effekt bei den IEGs *c-fos* (Abb. 3.24A), *Arc* (Abb. 3.24D) abgeschwächt und verschwindet völlig bei den IEGs *Egr1* (Abb. 3.24B) und *Egr2* (Abb. 3.24C).

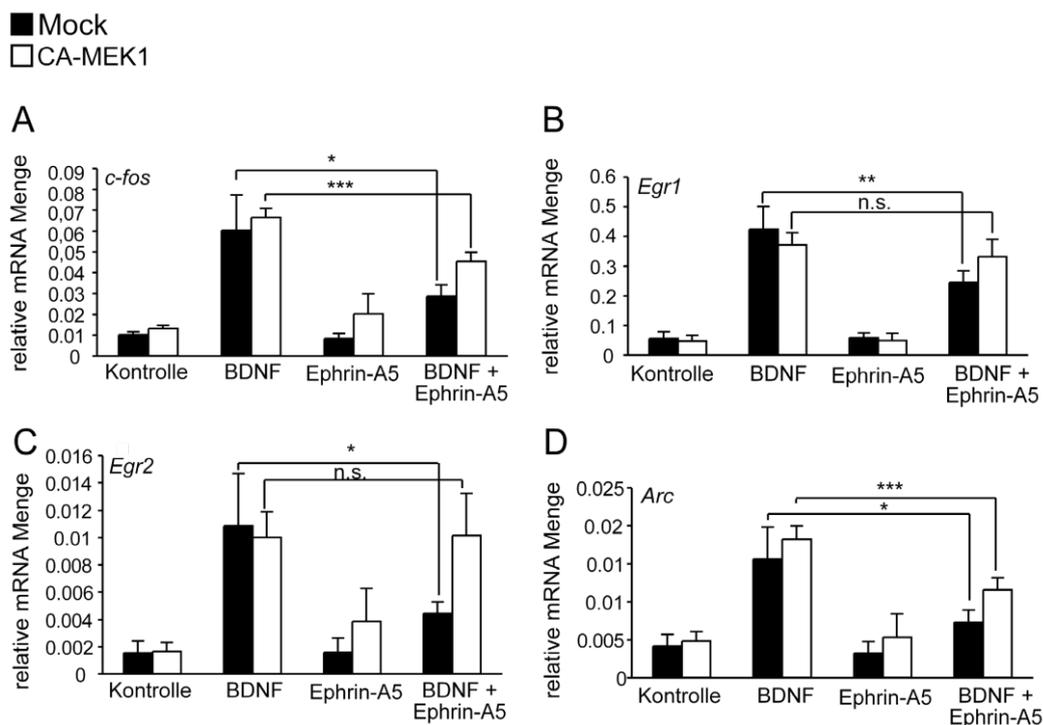


Abb. 3.24. MAP-Kinasen sind partiell an der EphA-vermittelten Inhibierung der BDNF-induzierten Genexpression beteiligt.

E17,5 kortikale Neurone wurden mit einem konstitutiv aktiven MEK1 Konstrukt (weiße Balken) oder Mock-elektroporiert (schwarze Balken) und 3 div kultiviert. Anschließend wurde mit den Lenkungsmolekülen für 20 min stimuliert und die mRNA Menge mittels qRT-PCR bestimmt. Als Referenzgen wurde *Gapdh* verwendet.

(A-D) In Mock-elektroporierten Zellen hemmt Ephrin-A5 die BDNF-induzierte Genexpression der IEGs *c-fos*, *Egr1*, *Egr2*, *Arc*. In CA-MEK-elektroporierten Neuronen ist dieser Effekt abgeschwächt bei *c-fos* (A) und *Arc* (D) und völlig verschwunden bei *Egr1* (B) und *Egr2* (C).

*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. Fehlerbalken repräsentieren die SA.

Eine erwartete robuste Induktion der Genexpression nach alleiniger BDNF Stimulation konnte nicht beobachtet werden. Um die Funktionstüchtigkeit des Konstrukts zu überprüfen, wurden cerebellare Neurone mit dem Plasmid transfiziert. Abbildung **Abb. 3.25** zeigt, dass verglichen mit der Mock-elektroporierten Kontrollsituation, CA-MEK1-elektroporierte Zellen eine erhöhte P-ERK Menge aufweisen, was für die Funktionstüchtigkeit des Konstrukts spricht. Zudem ist ein weiterer Anstieg der P-ERK Menge nach Serumstimulation (10 % FCS) zu verzeichnen, was ein Funktionieren des Plasmids weiter untermauert, da Serum die MAP-Kinasekaskade aktiviert.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass MAP-Kinasen zumindest partiell in der EphA-vermittelten Inhibierung der BDNF-induzierten Expression der IEGs involviert sind.

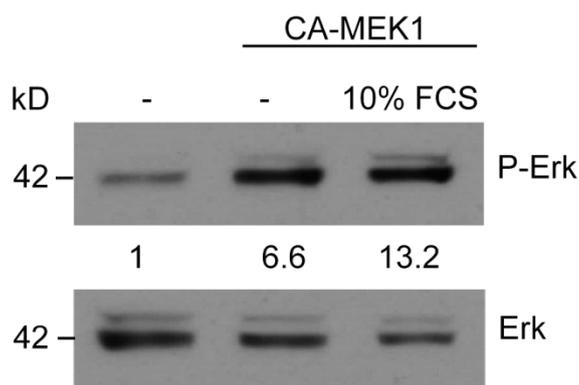


Abb. 3.25. Überprüfung der CA-MEK1 Funktionstüchtigkeit.

Cerebellare Neurone wurden mit dem CA-MEK1 Konstrukt elektroporiert und für 30 min mit 10% Serum stimuliert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Mock-elektroporierte Zellen. Proteinlysate wurden hergestellt und 10 µg Protein in 10 %-iges Acrylamidgel geladen und die entsprechenden Proteine mittels Western Blot detektiert (A). Die Zahlen links des Blots geben die Markerbanden in kDa an.

(A) Elektroporation mit CA-MEK1 zeigt eine erhöhte P-ERK Menge gegenüber der Kontrolle an. Der Effekt wird nach Serumstimulation mit 10 % FCS verstärkt.

(B) Quantifizierung von (A)

3.2.15 Luziferase Reporteragenassay zur Untersuchung der Genregulation von *Srf* durch Ephrin-A5 und BDNF

Vorangegangene Experimente (Abb. 3.20) haben gezeigt, dass Ephrin-A5 die BDNF-vermittelte Genexpression der IEGs antagonisiert und dieser Vorgang in Abhängigkeit von SRF geschieht. Um Auskunft über die BDNF und Ephrin-A vermittelten regulatorischen Signalwege von SRF (für Überblick siehe Einleitung 1.2.3) zu erlangen, wurden Luziferasereporteragenstudien durchgeführt. Zu diesem Zwecke wurden hauptsächlich drei unterschiedliche Konstrukte verwendet (Abb. 3.26), welche in der Abteilung von Prof. A. Nordheim, Universität Tübingen, etabliert wurden. Namentlich handelt es sich dabei um das (TSm)₂-Konstrukt, das (Tmm)₂ Konstrukt und das (mSm)₂-Konstrukt. Hierbei ist im (TSm)₂-Konstrukt dem Luziferasegen zweifach der *c-Fos* Promotor vorangeschaltet. Dieser enthält die typische TCF-Bindestelle (hierfür der Buchstabe T), welche auch als *Ets-Binding Site* (EBS) für Transkriptionsfaktoren der Ets-Familie bezeichnet wird. Des Weiteren enthält der Promotor die CArG-Box als SRF-Bindestelle (hierfür der Buchstabe S). Dem (Tmm)₂ Konstrukt hingegen fehlt die SRF-Bindestelle (deswegen das Kürzel m für „mutiert“). Das ermöglicht eine alleinige Untersuchung der TCF-abhängigen Weges durch SRF-Aktivierung. Dem (mSm)₂-Konstrukt fehlt die TCF-Bindestelle, ist aber im Besitz der Bindestelle für SRF, was eine primäre Untersuchung des MAL/MRTF-Signalweges ermöglicht. Allen Konstrukten fehlt die AP1 Bindestelle für Transkriptionsfaktoren wie z.B. Jun und Fos (ebenfalls der Buchstabe m für „mutiert“), was jedoch keinen Einfluss auf die Promotoraktivität hat.

Für den Reporteragenassay wurden kortikale Neurone isoliert, durch Elektroporation mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert und anschließend ausplattiert. Nach 3 Tagen *in vitro* (div) wurden die Zellen stimuliert und Luziferaseaktivität gemessen (Abb. 3.27). Zur Normalisierung der Luziferaseaktivität wurde die β -Galactosidaseaktivität bestimmt. Hierzu wurde der Quotient aus Firefly Lumineszenz/ β -Galactosidase Lumineszenz gebildet.

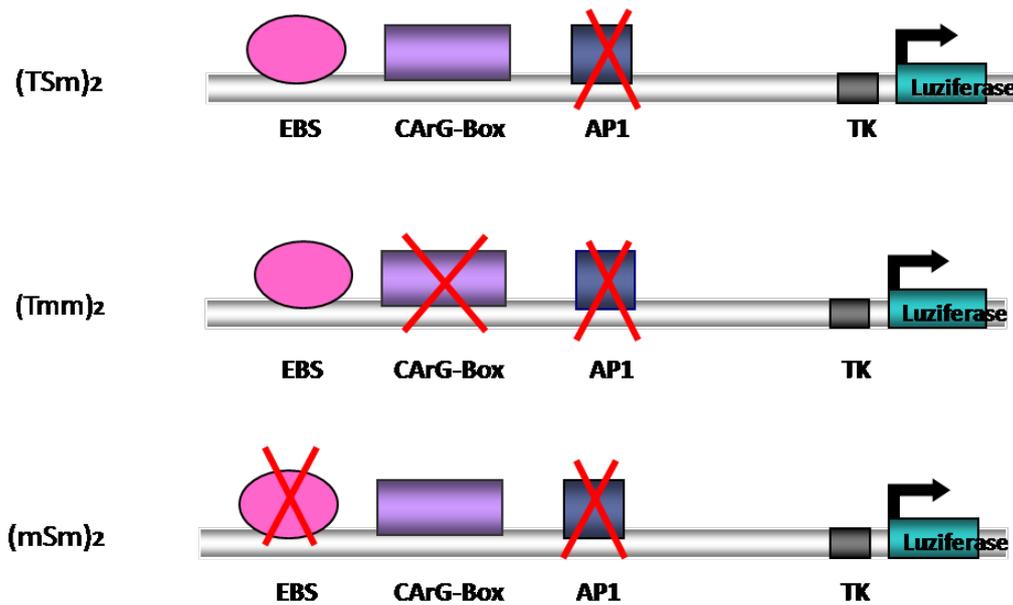


Abb. 3.26. Schematische Darstellung der Reporter-genkonstrukte $(TSm)_2$, $(Tmm)_2$ und $(mSm)_2$.

In allen drei Konstrukten ist dem Luziferasegen der *c-fos* Promotor vorangeschaltet. Das rote Kreuz markiert eine Deletion der entsprechenden Bindestelle. Näheres siehe Text.

EBS = *Ets*-Bindestelle; AP1 = Aktivator Protein 1; TK = minimaler Thymidinkinase Promotor

Kürzlich veröffentlichte Daten zeigen, dass die BDNF-vermittelte Transkription über den MAL-abhängigen Signalweg reguliert wird, bedingt durch die Phosphorylierung von MAL durch die MAP-Kinase ERK (Kalita et al., 2006; Wickramasinghe et al., 2008). In der Tat führt eine Stimulation mit BDNF, verglichen mit der unstimulierten Kontrollsituation, zu einer robusten Induktion der Luziferaseaktivität sowohl in $(TSm)_2$ als auch $(mSm)_2$ elektroporierten Zellen, unterbleibt jedoch in Zellen die mit dem $(Tmm)_2$ -Konstrukt transfiziert wurden (Abb. 3.27). Die Aktivierung des $(TSm)_2$ -Konstrukts lässt hierbei auf eine Beteiligung des TCF und MAL-Signalweges schließen. Da jedoch auch eine schnelle und robuste Aktivierung in $(mSm)_2$ -elektroporierten Zellen erfolgt, dieser Effekt jedoch in $(Tmm)_2$ -transfizierten Zellen unterbleibt, lässt sich schlussfolgern, dass BDNF über den MAL-Signalkaskade SRF aktiviert. Hierbei ist anzumerken, dass die BDNF-induzierte Transkription in $(mSm)_2$ -elektroporierten Zellen von kürzerer Dauer ist, als in Zellen, welche mit $(TSm)_2$ transfiziert wurden, was für eine Beteiligung des TCF- und MAL-Signalweges spricht. Die Regulierung der Genexpression nach Ephrin-A5-Fc Stimulation ist weniger prominent als nach Stimulation mit dem Neurotrophin

(Abb. 3.27). Dieses Resultat unterstützt jedoch die Daten in Abb. 3.20, da eine alleinige Applikation mit Ephrin-A5 die relative mRNA Menge der IEGs nicht beeinflusste. Die Luziferaseaktivität sank leicht, verglichen mit unstimulierten Kontrollzellen, 10 min nach Ephrin-A5-Fc Applikation in $(Tmm)_2$ - und $(TSm)_2$ -elektroporierten Neuronen. Dieser Effekt war auch noch nach 1 h zu verzeichnen. In $(mSm)_2$ -transfizierten Zellen ist der Effekt ebenso ersichtlich, jedoch erst 30 min nach Ephrin-A5-Fc Stimulation. Das lässt auf eine Beteiligung des TCF- wie auch MAL-Signalweges schließen. In SRF-defizienten Primärkulturen führte eine Stimulation mit BDNF oder Ephrin-A5 in keinem der Konstrukte zu einer Veränderung der Luziferaseaktivität (Daten siehe Diplomarbeit Christin Meier, Universität Tübingen), was auf eine SRF-abhängige Regulierung der Transkriptionsaktivität von *c-fos* schließen lässt.

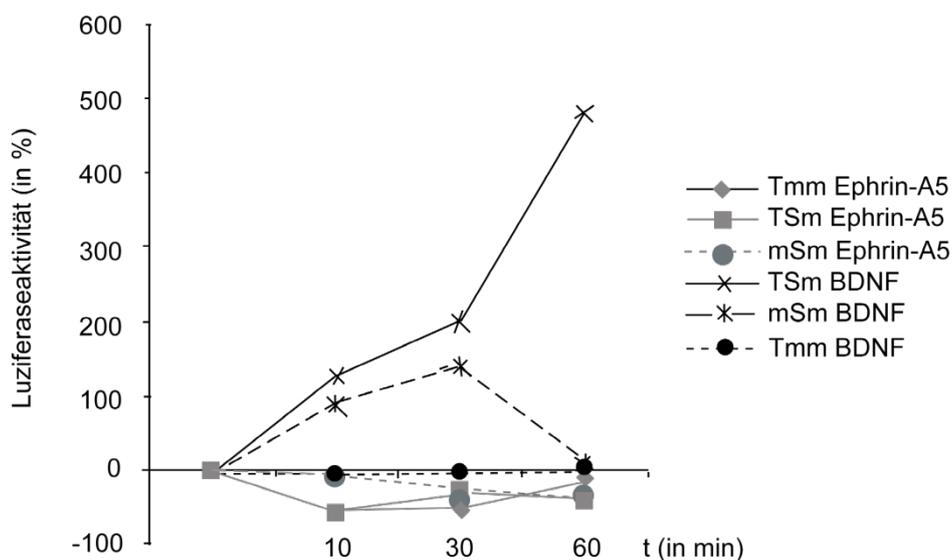
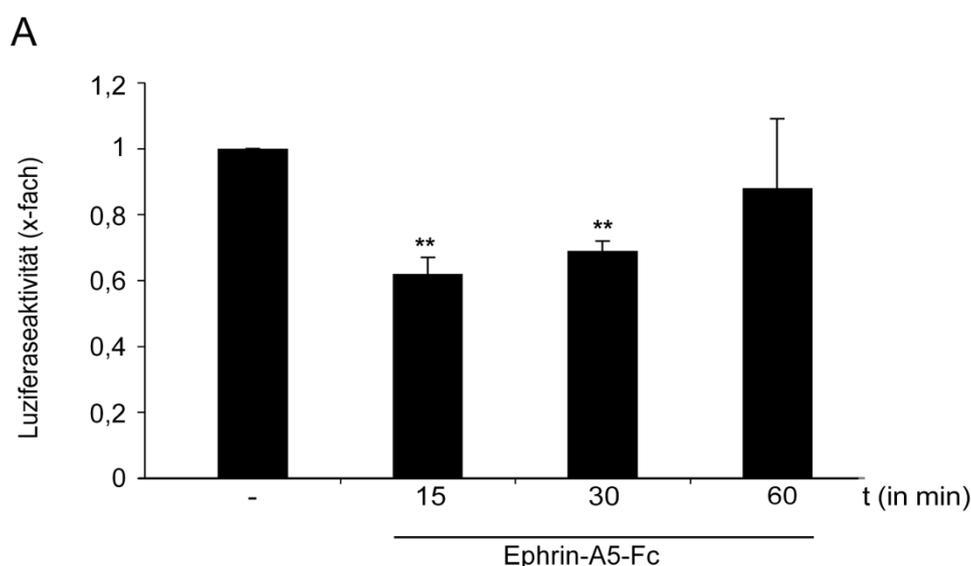


Abb. 3.27. Regulierung der Luziferaseaktivität nach BDNF und Ephrin-A5 Stimulation.

WT-Neurone wurden mit $(Tmm)_2$, $(TSm)_2$ und $(mSm)_2$ transfiziert und mit 10 ng/ml BDNF sowie 1 μ g/ml Ephrin-A5-Fc für unterschiedliche Zeiträume stimuliert. Anschließend wurde die Luziferaseaktivität gemessen. Unstimulierte Kontrollen wurden auf 0 gesetzt. Es ist eine rapide Induktion nach BDNF Stimulation in TSm und mSm elektroporierten Neuronen zu verzeichnen. Jedoch nicht in Tmm transfizierten. Ephrin-A5 stimulierte Primärneurone zeigten nur eine leichte Abnahme der Luziferaseaktivität, dafür jedoch in jedem der drei eingesetzten Konstrukte.

Abb. 3.27 zeigt Effekte auf die Transkription des IEGs *c-fos* nach alleiniger Stimulation der beiden Lenkungsmoleküle. Für dieses Experiment erwiesen sich die im vorangegangenen Experiment (**Abb. 3.27**) verwendeten Konstrukte als suboptimal, da zwar tendenzielle Effekte ersichtlich waren, jedoch mit großen Abweichungen innerhalb der unterschiedlichen Experimente. Deshalb wurde unter Verwendung eines anderen Reporter-genkonstrukts die Interaktion von BDNF und Ephrin-A5 untersucht (**Abb. 3.28**). Hierbei handelt es sich um ein Konstrukt, bei welchem dem Luziferasegen der *Egr1*-Promotor vorangeschaltet ist. Es handelt sich folglich auch um ein IEG wie in den anderen Plasmiden. Bereits 15 min nach Ephrin-A5 Stimulation ist eine Abnahme der Reporter-genaktivität um etwa 30% zu beobachten, wobei dieser Effekt 30 min anhält und danach abklingt (**Abb. 3.28A**). Wurde zuvor drei Stunden mit BDNF stimuliert und dann für verschiedene Zeitpunkte mit Ephrin-A5 ko-stimuliert, so ist zu erkennen, dass Ephrin-A5 die BDNF-induzierte Transkription des *Egr1*-Reporter-genkonstruktes bereits nach 15 min um etwa 20 % inhibiert (**Abb. 3.28B**). Dieser Effekt ist noch nach einer Stunde Ephrin-A5 Applikation zu beobachten. Die Ephrin-A5 vermittelte Inhibierung der Neurotrophin-induzierten Genexpression unterstützt die in **Abb. 3.20** gezeigten Daten.



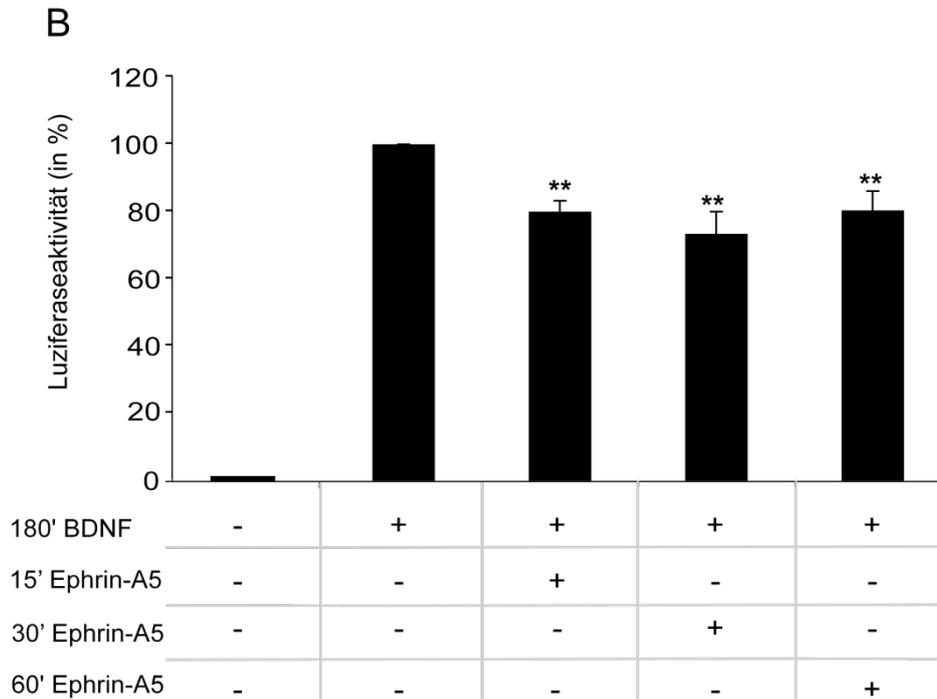


Abb. 3.28. Luziferaseaktivität des Egr1-Luc Reportergenkonstrukts nach Stimulation mit Lenkungsmolekülen.

Cerebellare WT-Neurone wurden mit dem Luziferasereportegenkonstrukt (Egr1)₂-Luc transfiziert, über unterschiedliche Zeiträume stimuliert und anschließend die Luziferaseaktivität gemessen. Als Kontrolle dienten unstimulierte Neurone.

(A) Neurone wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit 1 µg/ml Ephrin-A5-Fc stimuliert. Die unstimulierte Kontrollsituation wurde auf 1 gesetzt. Bereits nach 30 min ist eine Abnahme der Luziferaseaktivität um etwa 30% zu verzeichnen. Dieser Effekt ist nach 30 minütiger Stimulation noch ersichtlich, jedoch nach einer Stunde nicht mehr zu beobachten.

(B) Neurone wurden 3h mit 10ng/ml BDNF vorinkubiert und anschließend mit 1 µg/ml Ephrin-A5-Fc für die angegebenen Zeiträume kostimuliert. Die alleinige 4-stündige BDNF Applikation dient als Referenz und die erhaltenen Werte auf 100% Luziferaseaktivität gesetzt. Hierbei ist zu erkennen, dass bereits nach 15 minütiger Kostimulation mit Ephrin-A5 die Luziferaseaktivität signifikant abnimmt. Der Effekt verstärkt sich nach 30 min, erreicht mit etwa 20% Abnahme sein Maximum und hält bis eine Stunde nach simultanen Stimulationsbeginn an.

3.2.16 Untersuchung einer möglichen Beteiligung des EphA7-Rezeptors an der Ephrin-A5/ BDNF-Interaktion

Ephrin-A5 bindet an alle EphA-Rezeptoren (EphA1 – EphA8), sowie an den EphB2-Rezeptor (Gale et al., 1996; Himanen et al., 2004). Um nun einen spezifische Eph-Rezeptor auszumachen, über deren Signaltransduktion Ephrin-A5 die Signalweiterleitung von BDNF beeinflusst, erfolgte eine genauere Untersuchung des EphA7-Rezeptors. Da dieser stark im Gehirn exprimiert ist (www.brain-map.org) und eine Beteiligung an der Entwicklung topografischer Karten in verschiedenen Systemen (Rashid et al., 2005; Yue et al., 2002) sowie in der Laminierung des somatosensorischen Kortex nachgewiesen wurde (Miller et al., 2006), gilt EphA7 als geeigneter Kandidat für diese Untersuchung. Dazu wurden Mausmutanten verwendet, bei denen ubiquitär *Epha7* deletiert ist.

Als erstes musste nachgewiesen werden, dass die *Epha7*- Deletion der verpaarten Mäuse erfolgreich war (**Abb. 3.2930**). Hierfür wurden proteinbiochemische, mittels Western Blot Verfahren (**Abb. 3.29A, B**), sowie molekularbiologische Untersuchungen, mittels qRT-PCR (**Abb. 3.29C, D**), mit cerebellarem und kortikalem Gewebe durchgeführt.

Hierbei ist in *Epha7*-deletiertem Gewebe eine Abnahme der EphA7-Proteinmenge sowohl im Kortex, als auch Cerebellum zu verzeichnen. Eine völlige Deletion wurde nicht erreicht (**Ab Abb. 3.29A, B**). Um zu überprüfen, ob andere EphA-Rezeptoren durch die *Epha7*-Deletion beeinflusst wurden, wurde auch die EphA4-Proteinmenge untersucht. Hierbei ist eine leichte Abnahme in der EphA4-Proteinmenge im Kortex zu beobachten, jedoch nicht im Cerebellum (**Abb. 3.29A, B**). Eine mögliche Beeinflussung der *Epha7*-Deletion auf die EphA4-Rezeptormenge ist folglich nicht auszuschließen. Neben der zu erwartenden Bande des EphA7-Rezeptors (etwa 100 kD), wurde eine weitere Bande bei 75 kD in wildtypischen Gewebe detektiert. Hierbei handelt es sich höchstwahrscheinlich um die trunkierte Form des EphA7-Rezeptors (EphA7_{trunc}) (Ciossek et al., 1995). In EphA7-defizientem Gewebe ist diese Splicevariante nicht mehr zu detektieren.

Ähnliche Ergebnisse ergaben sich bei der Analyse der *Epha7* mRNA Menge. Eine Verminderung der *Epha7* mRNA Menge ist vor allem im Cerebellum deutlich erkennbar (**Abb. 3.29 D**). Andere Rezeptoren, wie der EphA4 oder EphB2 wurden auf mRNA-Ebene durch die *Epha7*-Deletion nicht beeinflusst (**Abb. 3.29C, D**).

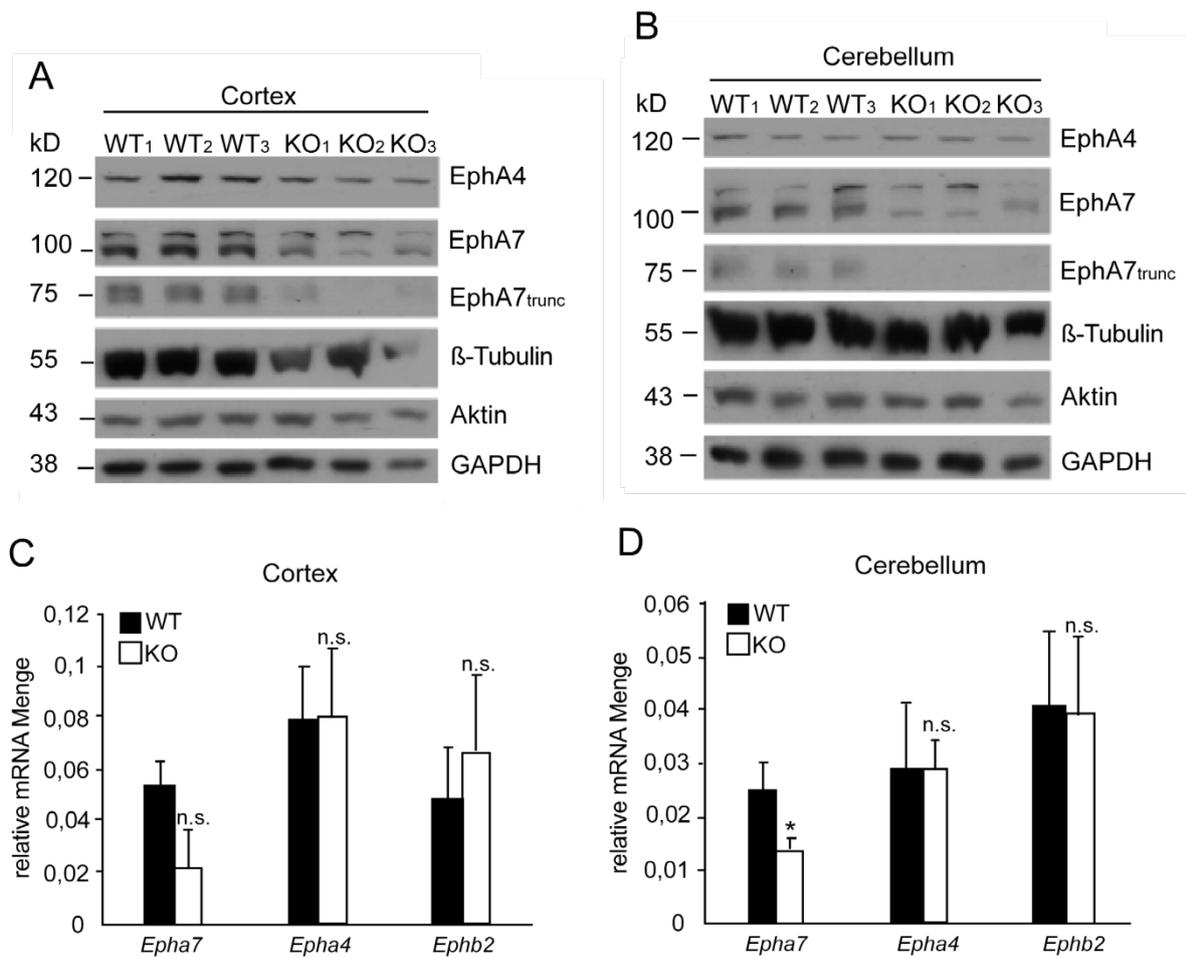


Abb. 3.29. Analyse der Protein- und mRNA-Menge des EphA7-Rezeptors.

Von cerebellarem und kortikalem P12 Wildtyp- und EphA7^{-/-}-Gewebe wurde die Proteinmenge (A, B) und mRNA Menge (C, D) analysiert. Es wurden je drei Wildtyp Mäuse und drei EphA7 Mutanten verwendet.

(A) Proteinmengenbestimmung aus kortikalem Gewebe. Die EphA4- und EphA7-Rezeptormenge nimmt in EphA7-defizientem Gewebe ab verglichen mit WT-Gewebe.

(B) Proteinmengenbestimmung aus cerebellarem Gewebe. Die EphA7-Rezeptormenge nimmt in EphA7-defizientem Gewebe ab, verglichen mit WT-Gewebe. EphA4-Rezeptormenge bleibt gleich.

(C) qRT-PCR aus kortikalem Gewebe. Die *Epha7*-mRNA Menge nimmt in EphA7-defizientem Gewebe gegenüber WT ab. Weitere Rezeptoren wie *Epha4* oder *Ephb2* sind nicht betroffen.

(D) qRT-PCR aus cerebellarem Gewebe. Die *Epha7*-mRNA Menge nimmt in defizientem Gewebe signifikant gegenüber WT ab. Weitere Rezeptoren wie *Epha4* oder *Ephb2* sind nicht betroffen.

*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001. Fehlerbalken repräsentieren die SA.

3.2.16.1 EphA7 beeinflusst die Wachstumskegelmorphologie aber nicht die Ephrin-Neurotrophin Interaktion

Nachdem erfolgreich gezeigt wurde, dass die Deletion von *Epha7* zu einer Verminderung der Rezeptormenge führt, konnten erste Wachstumskegelstudien durchgeführt werden, um zu überprüfen inwiefern EphA7 an der Ephrin-Neurotrophin Interaktion beteiligt ist. Hierfür wurden hippocampale Wildtyp- und EphA7-defiziente Neurone kultiviert und mit BDNF und/ oder Ephrin-A5 stimuliert (**Abb. 3.30**).

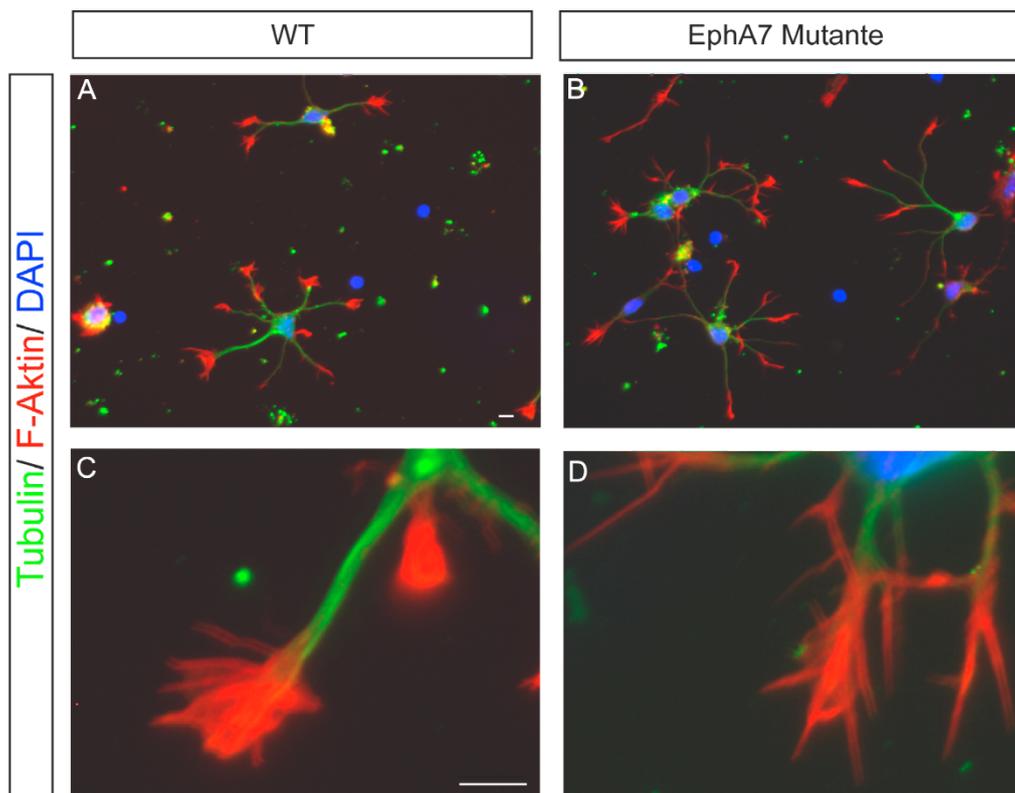
Der Vergleich zwischen Wildtyp-Neuronen und *Epha7*-Mutanten zeigt bezüglich der Neuritenanzahl und Neuritenlänge keine Veränderung (**Abb. 3.30A-D**, Quantifizierung in **Abb. 3.30H, J**). Jedoch ist ein deutlicher morphologischer Unterschied zwischen den Wachstumskegeln wildtypischer (**Abb. 3.30A, C**) und mutierter Neuronen (**Abb. 3.30B, D**) zu erkennen. Die Wachstumskegel EphA7-defizienter Neurone zeigen eine deutlich geringere Fläche auf (**Abb. 3.30E**), haben jedoch viel längere und mehr Filopodien (**Abb. 3.30F, G, J**) als wildtypische Neurone.

Der nächste Schritt sah vor, die Sensitivität der EphA7-defizienten Neurone gegenüber Ephrin-A5 mittels einer Titrationsreihe zu testen. Hierfür wurden hippocampale *Epha7*^(+/+)- und *Epha7*^(-/-)-Neurone mit drei verschiedenen Ephrin-A5-Fc Konzentrationen stimuliert. Während in der unstimulierten Kontrollsituation etwa die Hälfte aller Wachstumskegel kollabiert sind, so ist bei der höchsten Ephrin-A5-Fc Konzentration ein fast vollständiger Wachstumskegelkollaps sowohl in wildtypischen also auch in EphA7-defizienten Neuronen zu beobachten (**Abb. 3.30K**). Das lässt darauf schließen, dass der EphA7-Rezeptor für den Ephrin-A5 induzierten Wachstumskegelkollaps in hippocampalen Neuronen entbehrlich ist. Stattdessen wird dieser über andere Eph-Rezeptoren (z.B. EphA4, EphB2, siehe Einleitung 3.1.15) vermittelt.

Abschließend wurde nun überprüft, ob EphA7 für die Ephrin-A5 vermittelte Inhibierung der BDNF-induzierten Wachstumskegelmotilität benötigt wird (**Abb. 3.30L**). Hierfür wurden hippocampale Neurone für 45 min mit BDNF, Ephrin-A5-Fc oder beiden Lenkungsmolekülen gleichzeitig stimuliert. Dabei war zu beobachten, dass Ephrin-A5-Fc in *Epha7* mutierten Neurone ebenso wie in wildtypischen den BDNF-induzierten Anstieg der Wachstumskegelfläche entgegenwirkt (**Abb. 3.30L**). Gleiches gilt für die Filopodienanzahl und Filopodienlänge (Daten nicht gezeigt).

Aus diesen Daten ist zu vermuten, dass EphA7 für den inhibierenden Effekt auf die Neurotrophin-induzierte Wachstumskegelmotilität nicht benötigt wird. Es ist wahrscheinlich, dass die EphA7-Defizienz durch andere Eph-Rezeptoren kompensiert wird.

Deshalb lässt sich zusammenfassend sagen, dass EphA7 einen Einfluss auf die Wachstumskegelmorphologie hat, für die Ephrin-BDNF-Interaktion jedoch durch andere Rezeptoren ersetzt werden kann.



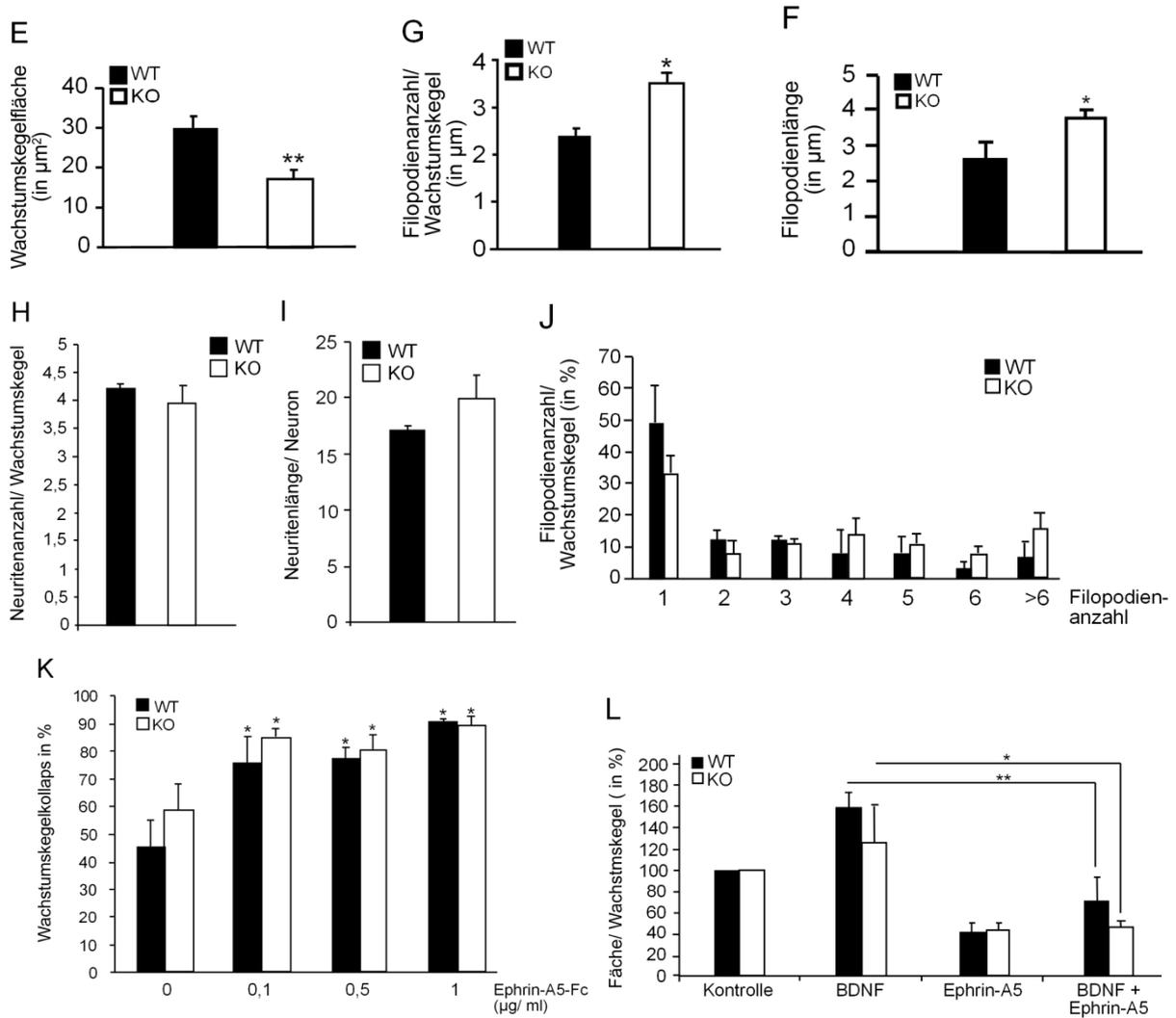


Abb. 3.30. EphA7 beeinflusst die Wachstumkegelmorphologie aber nicht die Ephrin-BDNF-Interaktion

P1 hippocampale Neurone von *Epha7^{-/-}* und *Epha7^{+/+}* wurden angefertigt und mit BDNF und/ oder Ephrin-A5-Fc für 45 min stimuliert. Anschließend wurden Tubulin (grün), F-Aktin (rot) und DAPI (blau) angefärbt.

(A-D) EphA7-defiziente Neurone (B, D) weisen keine Veränderungen in Neuritenanzahl und -länge auf (H, I) verglichen mit Wildtyp-Neuronen (A, C). Jedoch ist die Wachstumkegelfläche stark verkleinert (E). Filopodienanzahl und -länge hingegen ist vergrößert in *Epha7*-deletierten Neuronen (G, F, J).

(E, G, F, J) Quantifizierung der Wachstumkegelfläche (E), Filopodienanzahl (G, J) und Filopodienlänge (F).

(H, I) Quantifizierung der durchschnittlichen Neuritenanzahl (H) und Neuritenlänge (I).

(K) Ephrin-A5-Fc Titrationsreihe. Drei unterschiedliche Konzentrationen (0,1 $\mu\text{g/ml}$, 0,5 $\mu\text{g/ml}$ und 1 $\mu\text{g/ml}$) wurden appliziert und der Wachstumkegelmorphologie prozentual bestimmt. Sowohl *Epha7^{+/+}* als auch *Epha7^{-/-}* sind gegenüber Ephrin-A5 sensitiv, zu erkennen am induzierten Wachstumkegelmorphologie.

(L) 45 minütige Stimulation hippocampaler Neurone mit Ephrin-A5-Fc, BDNF oder beiden Substanzen simultan. Sowohl in *Epha7^{+/+}* als auch *Epha7^{-/-}* kann Ephrin-A5 die BDNF-induzierten Effekt auf den Wachstumkegel antagonisieren.

Statistische Signifikanz wurde in Beziehung zu Wildtyp/ Kontrolle berechnet.

*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (SA).

Maßstab (A, B) = 50 μm ; Maßstab (C, D) = 2 μm

n = 3

3.2.16.2 EphA7 beeinflusst nicht die Translokation von P-ERK in den Zellkern

In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Ephrin-A5 die BDNF-induzierte Translokation von P-ERK in den Zellkern inhibiert (Abb. 3.16). Zwar zeigte eine Deletion von *Epha7* keinen Einfluss auf die Wachstumskegelmotilität (Abb. 3.30), dennoch wurde untersucht ob der Rezeptor eine mögliche Rolle in der Translokation von P-ERK in den Zellkern spielt (Abb. 3.31). Hippocampale Neurone wurden 45 min mit BDNF, Ephrin-A5 oder beiden Molekülen simultan stimuliert und das Verhältnis von P-ERK im Zytosol/ Zellkern bestimmt. Abbildung 3.31 zeigt, dass sowohl in EphA7-defizienten wie auch in Wildtyp-Neuronen die BDNF-induzierte Translokation von P-ERK in den Zellkern durch Ephrin-A5 inhibiert wird, was mit den Daten in Abb. 3.16 korreliert. Daraus lässt sich vermuten, dass EphA7 für die Ephrin-A5 vermittelte Inhibierung der Neurotrophin-induzierten P-ERK Translokation nicht notwendig ist.

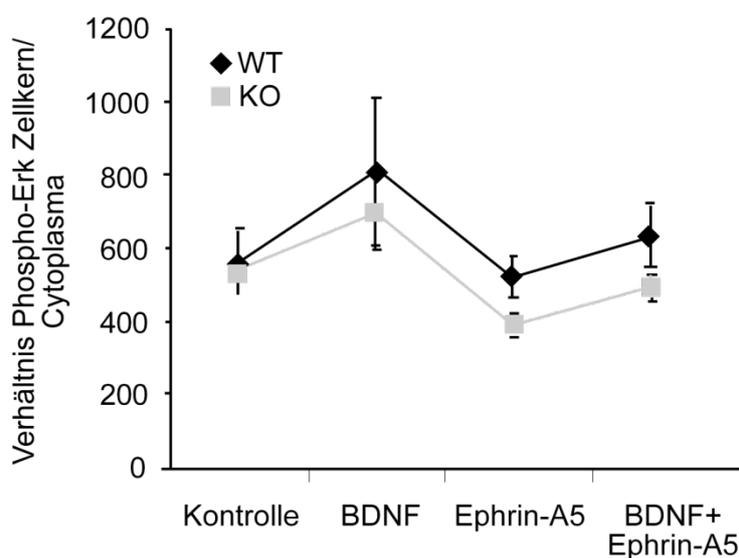


Abb. 3.31. EphA7 ist für die EphrinA-vermittelte Hemmung der BDNF-induzierten Translokation von P-ERK nicht notwendig.

Hippocampale Neurone wurden 1 div kultiviert und anschließend für 15 min mit BDNF und/ oder Ephrin-A5-Fc stimuliert. Das Verhältnis von zytoplasmatischer zu nukleärer ERK-Intensität wurde bestimmt. Die ermittelten Werte für die Kontrolle wurden auf 1 gesetzt und dienten als Bezug. Schwarze Linien repräsentieren Wildtypische Neurone, graue *Srf*-deletierte.

Es ist kein Unterschied zwischen wildtypischen und mutierten Neuronen in der Translokation zu erkennen. Dies lässt auf einen EphA7-unabhängigen Vorgang schließen.

3.2.17 Die Moosfaserwegfindung ist in *Epha7*-deletierten Mäusen nicht gestört

Ziel dieser Arbeit ist es u.a. axonale Lenkungsmechanismen im murinen Hippocampus zu untersuchen und in diesen Prozess involvierte Moleküle zu bestimmen.

Zwar wird der EphA7-Rezeptor für die EphrinA-BDNF-Signalinteraktion nicht benötigt (**Abb. 3.30**), dennoch kann er für die axonale Moosfaserwegfindung von Bedeutung sein, da dieser Rezeptor in der axonalen Lenkung retinaler Ganglienzellen und in der Wegfindung hippocampaler Projektionen eine wichtige Rolle übernimmt (Miller et al., 2006; Rashid et al., 2005; Yue et al., 2002). Um das zu überprüfen, wurden Hippocampi von *Epha7*-Mutanten und Kontrolltieren isoliert, Kryostatschnitte angefertigt und immunhistochemische Färbungen unter der Verwendung entsprechender Antikörper durchgeführt (**Abb. 3.32**).

Der Vergleich zwischen Wildtyp- (**Abb. 3.32A**) und EphA7-defizientem Gewebe (**Abb. 3.32D**) zeigt deutlich eine verminderte EphA7-Rezeptormenge in *Epha7*-Mutanten. Die Hauptmenge dieses Rezeptors befindet sich weniger auf den Moosfaseraxonen, sondern in der Zellkörperschicht des Gyrus dentatus sowie der CA1- und CA2-Region. Die CA3-Zellkörperschicht scheint hierbei ausgespart (**Abb. 3.32A, D**). Diese Daten unterstützen bereits publizierte Daten zur Untersuchung der EphA7-Ephrin-A5-Interaktion im somatosensorischen Kortex (Miller et al., 2006). Mittels des neuronalen Markers Calbindin können die Körnerzellen des Gyrus dentatus und dessen Moosfaseraxone angefärbt werden. Hierbei ist zwischen Kontrolltieren und EphA7-defizienten Mäusen kein Unterschied in der Moosfaserwegfindung oder im Aufbau des Gyrus dentatus zu erkennen (**Abb. 3.32B, E**, Vergrößerung in **Abb. 3.32C, F**).

Daraus lässt sich schließen, dass der EphA7-Rezeptor für die korrekte Moosfaserwegfindung nicht essentiell ist und die Deletion höchstwahrscheinlich durch die Expression anderer EphA-Rezeptoren ausgeglichen wird.

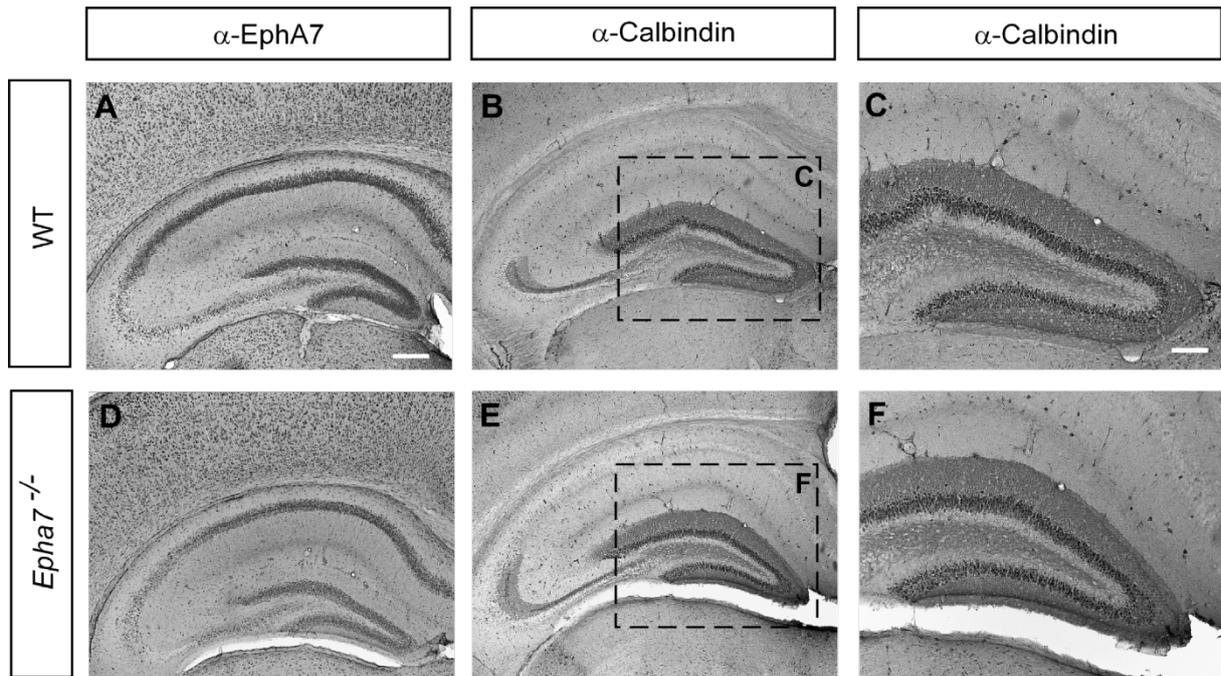


Abb. 3.32. Der EphA7-Rezeptor ist für eine korrekte Moosfaserwegfindung nicht essentiell.

Von P14 alten Mäusen (Wildtyp und *Epha7*-Mutanten) wurden hippocampale Vibratomschnitte angefertigt und die EphA7-Rezeptorexpression mittels einem EphA7-Antikörper sowie Körnerzellen des DG und Moosfasern mittels eines Calbindin-Antikörpers angefärbt.

(A, D) Die Menge an EphA7-Rezeptoren ist in defizientem Gewebe (D) geringer als bei Kontrolltieren (A). Hauptsächlich ist der Rezeptor in der CA1- und CA2-Zellkörperregion sowie im DG lokalisiert. Auf Moosfaseraxonen und in der CA3-Zellkörperregion ist kein Signal erkennbar.

(B, C, E, F) Wildtyp (B, Vergrößerung in C) und Mutanten (E, Vergrößerung in F) zeigen keine Veränderung in der Moosfaserwegfindung sowie im Aufbau des DG.

Maßstab (A, B, D, E) = 200 μ m; Maßstab (C, F) = 100 μ m

4 Diskussion

4.1 Signalweiterleitung des EphA- und TrkB-Rezeptors in der axonalen Lenkung hippocampaler Neurone

4.1.1 Eine Interaktion der EphA- und TrkB-Signalweiterleitung beeinflusst die Motilität hippocampaler Neurone

Für eine korrekte Entwicklung des zentralen Nervensystems sind axonale Lenkungsmoleküle unabdingbar. Bestandteil dieser Arbeit war es zu untersuchen, wie die auf hippocampale Neurone unterschiedlichen Wirkungen des eher repulsiv agierenden Ephrin-A5 und des vornehmlich attraktiv wirkenden Lenkungsmoleküls BDNF innerhalb eines Wachstumskegels integriert werden. Hierfür wurden hippocampale Neurone gleichzeitig mit beiden Lenkungsmolekülen stimuliert. Die Applikation von BDNF führte in neuronalen Kulturen (**Abb. 3.8**) und in der *in-vivo* ähnlichen organotypischen Schnittkultur (**Abb. 3.13**) zu einer Erhöhung der neuronalen Verzweigungen. Dieses Ergebnis geht mit vorangegangenen Studien einher, in denen eine attraktive Wirkung von BDNF auf die axonale Lenkung beschrieben wurde (Cohen-Cory and Fraser, 1995; Danzer et al., 2002; Lowenstein and Arsenault, 1996; Marler et al., 2008). Die durch Ephrin-A5 vermittelte vorwärts gerichtete EphA-Rezeptoraktivierung resultierte in Primärneuronen in einem Wachstumskegelkollaps (**Abb. 3.7**). Dieser wird u.a. als Modell für die axonale Lenkung verwendet, da der *in-vitro* verursachte Wachstumskegelkollaps *in-vivo* mit einem repulsiven Verhalten der Neurone einhergeht. Des Weiteren wirkte die Ephrin-A5 vorwärts gerichtete Signaltransduktion der BDNF-induzierten Veränderung der Filopodienlänge und Neuritenformation/-verzweigungen entgegen (**Abb. 3.7 und 3.8**). Die in diesen *in-vitro* Daten erhaltenen Ergebnisse deuten auf eine BDNF-Ephrin Interaktion. Diese kann bedeutsam für den physiologischen Vorgang des axonalen Prunings sein. Bei diesem handelt es sich um ein initiales

Überschießen der Axone über ihr eigentliches Zielgebiet hinaus, mit anschließender Retraktion der Axone bis die vorgesehene Terminationszone erreicht ist (siehe auch 1.1.4.4). Das anfängliche Überschießen kann durch Neurotrophine wie BDNF bedingt sein, wohingegen die Rückbildung der Axone repulsiver Natur ist. Für das visuelle System wurde u.a. dieser Vorgang schon beschrieben. Hierbei übernimmt das Neurotrophin eine wachstumsfördernde Wirkung auf das retinale Axon und führt zum Überschießen über das eigentliche Zielgebiet und verstärkter Ausbildung von Verzweigungen. In folgenden Entwicklungsphasen erfolgt durch Ephrin-A5 eine Zurückbildung der Axone bis hin zum Zielgebiet, sowie zu einer Eliminierung der überschüssigen Verzweigungen (Cohen-Cory and Fraser, 1995; Marler et al., 2008). Dieser Pruningprozess ist für die in dieser Arbeit verwendeten hippocampalen Axone ebenso denkbar. Der wachstumsfördernde Effekt von BDNF könnte anschließend durch die vorwärts gerichtete EphA-Signalweiterleitung die axonale Retraktion fördern. Direkt übertragbar wäre dieser Vorgang in der Wegfindung hippocampaler Moosfasern. Hierbei könnte eine solche Interaktion zwischen BDNF und Ephrin-A5 z.B. das Pruning infrapyramidaler Moosfasertrakte ermöglichen. So konnte *in-vivo* bereits gezeigt werden, dass Ephrine an dem Retraktionsprozess infrapyramidaler Moosfaseraxone involviert sind (Martinez et al., 2005; Xu and Henkemeyer, 2009). Auch für die rückwärts gerichtete Ephrin-A Signalweiterleitung konnte gezeigt werden, dass diese ebenso die BDNF-vermittelte Ausbildung von Verzweigungen hemmt (Marler et al., 2008). So kann zusammenfassend festgestellt werden, dass sowohl die vorwärts als auch die rückwärts gerichtete Ephrin-A Signalweiterleitung der BDNF-Aktivität entgegenwirkt.

Durch die Verwendung von SRF-defizienten Primärneuronen konnte zudem untersucht werden, welche Rolle der Transkriptionsfaktor SRF bei der Ephrin-A5 vermittelten Hemmung der BDNF-induzierten Motilität der Neuronen spielt. Hierbei stellte sich heraus, dass in Abwesenheit von SRF weder BDNF noch Ephrin-A5 die Wachstumskegeldynamik beeinflussen konnten (**Abb. 3.7 und 3.8**).

Als wichtiger Modulator der Aktindynamik (Knoll and Nordheim, 2009; Posern and Treisman, 2006; Stern et al., 2009), scheint SRF zunächst für eine funktionierende physiologische Regulierung des Zytoskeletts durch externe Stimuli unabdingbar zu sein. Dennoch stellt sich die Frage, inwiefern SRF für die Wirkung der beiden

Lenkungsmoleküle auf die Neuronen tatsächlich benötigt wird, da bereits *Srf*-deletierte Primärneurone eine schwere morphologische Störung aufweisen (**Abb. 3.7C, D**). Es ist möglich, dass der Transkriptionsfaktor unabhängig der TrkB und EphA-induzierten Signalwege auf die Wachstumskegeldynamik Einfluss nimmt, z.B. durch die direkte Regulierung von Aktin und damit des Zytoskeletts. Die Abwesenheit von SRF könnte nun die Dynamik des Wachstumskegels „einfrieren“, externe Stimuli wie die Applikation der Lenkungsmoleküle würden keinen Effekt mehr zeigen. Um eine direkte Verbindung von SRF sowie BDNF und Ephrin-A5 zu zeigen, bedarf es weiterer Experimente.

Im Gegensatz zu den *in-vitro* Experimenten an Primärneuronen, in denen Ephrin-A5 gegensätzlich zu BDNF agierte (**Abb. 3.7** und **3.8.**), zeigte die Applikation von BDNF und Ephrin-A5 in der *in-vivo* nahen organotypischen Schnittkulturen den gleichen Effekt auf hippocampale Axone. Hierbei kam es sowohl nach BDNF Applikation, als auch nach Stimulation mit Ephrin-A5 zu einer Defaszikulierung und einem ektopischen Eintreten suprapyramidaler Moosfasern in das *Stratum pyramidale* der CA3-Region (**Abb. 3.13**). Unsere Daten unterstützen vorangegangene Experimente, in denen BDNF eine verzweigungsfördernde Wirkung auf hippocampale Axone zugeschrieben wurde (Danzer et al., 2002). Die Dateninterpretation für Ephrin-A5 ist aufgrund der Möglichkeit einer bidirektionalen Signalweiterleitung (siehe Einleitung) weitaus komplizierter als für BDNF. Zur Erklärung dieses Phänomen soll sich auf die Ephrin-A5-AP-Färbung (**Abb. 3.11**) bezogen werden. Dies ist aufgrund ähnlicher Bindungseigenschaften des Ephrin-AP-Konstrukts und des löslichen Ephrin-A5-Fc an Eph-Rezeptoren möglich. Die Ephrin-A5-AP-Färbung ermöglicht nicht nur die Visualisierung der EphA-Rezeptoren, sondern markiert auch die Gebiete des Hippocampus, an denen höchstwahrscheinlich in der organotypischen Kultur das exogen appliziertes Ephrin-A5-Fc bindet (**Abb. 3.13**). Somit wurde aufgrund der Inkubation mit Ephrin-A5-Fc ein repulsives Gebiet im *Stratum lucidum* geschaffen, indem die Menge an bereits vorhandenem endogenen Ephrin-A5 erhöht wurde. Diese gesteigerte Ephrin-A5 Menge könnte möglicherweise EphA-positive Moosfaseraxone daran hindern innerhalb des *Stratum lucidum* zu verlaufen und damit gleichzeitig ein Einwandern der Moosfasern in das Ephrin-A-freie *Stratum pyramidale* fördern. Prinzipiell kann exogen zugeführtes Ephrin-A5 die vorwärts

gerichtete EphA-Signaltransduktion aktivieren und dadurch eine kontaktvermittelte Repulsion der Axone herbeiführen. Ein alternativer Mechanismus wäre, dass Ephrin-A5 an EphA-Rezeptoren bindet, somit als Ligand agiert und dadurch die rückwärts gerichtete Signaltransduktion durch Ephrin-As verhindert (siehe 3.2.4. „Maskierungsphänomen“).

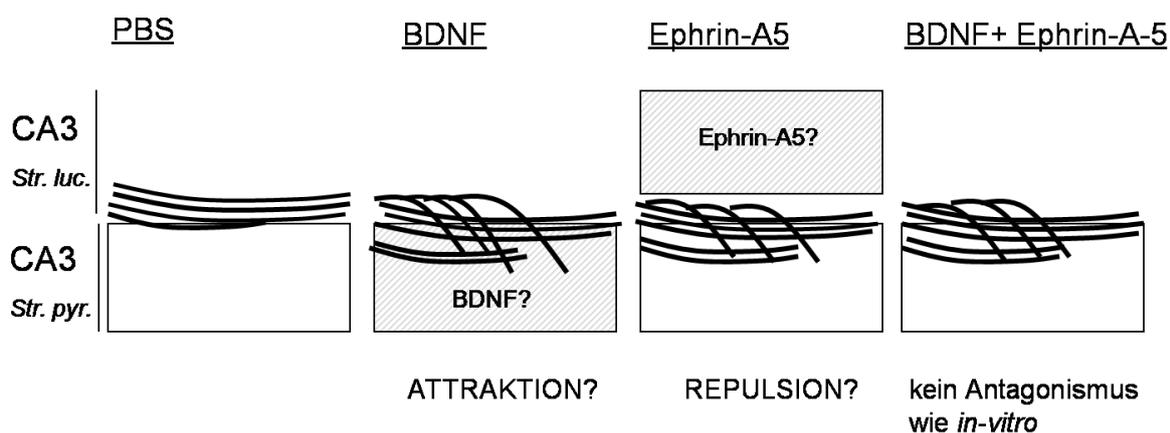


Abb. 4.1 Schemata zur Erklärung der *in-vivo* nahen Daten.

Schwarze Streifen symbolisieren das suprapyramidale Bündel des Moosfasertraktes.

Durch exogen appliziertes Ephrin-A5 könnte ein repulsives Territorium innerhalb des *Str. luc.* (grau schraffierte Fläche) geschaffen werden, was zu einem Eintreten der Moosfaseraxone ins *Str. pyr.* führt.

CA3 = CA3-Region des Hippocampus, *Str. luc.* = Stratum lucidum, *Str. pyr.* = Stratum pyramidale

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die EphA-Ephrin-A-Interaktion die Moosfaserwegfindung in dem *in-vivo* nahen System der organotypischen Kultur beeinflusst, der genaue Mechanismus jedoch schwer zu entschlüsseln ist.

4.1.2 Die MAPK-Kaskade: das Bindeglied zwischen der BDNF und Ephrin-A5 Interaktion

Als nächste Frage stellt sich, wie und wo die vorwärts gerichtete EphA- und BDNF-Signaltransduktion miteinander interagieren? Eine Ko-Lokalisation des EphA- und TrkB-Rezeptors konnte nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die jeweilige Rezeptoraktivierung, gemessen in der Phosphorylierung des Rezeptors, wurde durch gleichzeitige Applikation von BDNF und Ephrin-A5 ebenfalls nicht beeinflusst (Abb. 3.14). Diese Resultate sprechen gegen eine direkte EphA und TrkB Interaktion.

Die Daten weisen vielmehr darauf hin, dass die gemeinsame Schnittstelle der EphA- und Neurotrophin-Signalweiterleitung die MAPK-Kaskade darstellt. Hierbei wurde durch EphA-Rezeptoraktivierung zum einen die Grundmenge des phosphorylierten ERK erniedrigt und zum anderen die BDNF-induzierte ERK-Aktivität gehemmt (**Abb. 3.14**). Unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse (**Abb. 3.15**) und zuvor publizierten Daten (Nievergall et al., 2010; Parri et al., 2005; Yue et al., 2008; Zhuang et al., 2007) kommen Phosphatasen zur Erklärung dieses molekularen Mechanismus in Betracht. Phosphatasen sind negative Regulatoren der phosphorylierenden Kinasen. Generell resultiert die Phosphataseaktivität in einer Entfernung von Phosphatgruppen, wobei es folglich zu einer Dephosphorylierung des Substrats kommt.

So wurde bereits gezeigt, dass die Protein-Tyrosin Phosphatase Shp2 (SH2 Domäne-beinhaltende Protein Tyrosine Phosphatase) an den aktivierten EphA-Rezeptor rekrutiert wird, was zu einer negativen Regulierung der Fokalen Adhäsionskinase (FAK) und Integrine führt (Miao et al., 2000). Weitere Forschungsdaten belegen, dass Protein-Tyrosin Phosphatasen in dem Ephrin-A5 vermittelten Wachstumskegelkollaps involviert sind (Yue et al., 2008).

Die Phosphatasen Ship-2 (Zhuang et al., 2007) sowie PTB1B (Nievergall et al., 2010) werden mit der Eph-Rezeptor Internalisierung in Verbindung gebracht, wodurch u.a. biologische Prozesse wie die Eph/Ephrin-vermittelte Zellpositionierung oder der Ephrin-induzierte Wachstumskegelkollaps reguliert werden.

In biochemischen Versuchen in Primärkulturen, die mit verschiedenen Phosphataseinhibitoren vorinkubiert wurden, war nach Ephrin-A5 Applikation keine Inhibierung der ERK-Aktivität mehr zu verzeichnen (**Abb. 3.15**). Es ist demzufolge denkbar, dass es durch Ephrin-A5 zu einer Dephosphorylierung der Ausgangsmenge an phosphoryliertem ERK durch Phosphatasen kommt. Auch der inhibierende Effekt auf die BDNF-induzierte ERK-Aktivierung wäre durch die Aktivierung von Phosphatasen zu erklären. Jedoch handelt es sich in diesem Experiment (**Abb. 3.15**) um eine alleinige Ephrin-A5 Applikation. Eine gleichzeitige BDNF/Ephrin-A5-Stimulation ist in zukünftigen Experimenten durchzuführen, um eine korrekte Schlussfolgerung zu treffen, dass durch Ephrin-A5 Phosphatasen vermehrt rekrutiert und aktiviert werden und diese dann die BDNF-induzierte ERK-Aktivierung blockieren.

Kommt es zu einer Aktivierung von ERK, so kann es im Folgenden zu einer Translokation der MAP-Kinase in den Zellkern kommen. Immunzytochemische Versuche haben aufgedeckt, dass eine TrkB-Rezeptoraktivierung zu einer P-ERK Translokation in den Zellkern führt (**Abb. 3.16**). Eine EphA-Rezeptoraktivierung durch Ephrin-A5 hingegen führt zu einer Blockierung der BDNF-induzierten Translokation von ERK in den Zellkern (**Abb. 3.16**). Wie oben erwähnt, konnte mittels biochemischer Versuche gezeigt werden, dass BDNF bei gleichzeitiger Ephrin-A5 Applikation nicht mehr in der Lage ist ERK zu aktivieren. Es kann vermutet werden, dass es aufgrund dieser fehlenden Aktivierung nun auch zu keiner Translokation von P-ERK nach BDNF/ Ephrin-A5 Stimulation in den Zellkern mehr kommen kann.

Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass es nach Ephrin-A5 Stimulation hippocampaler Neurone zu einer Sequestrierung von P-ERK vornehmlich in den Neuriten (**Abb. 3.15**) kam. Die P-ERK Akkumulation waren ebenso nach gleichzeitiger Stimulation mit BDNF zu beobachten, was dafür spricht, dass dieser Ephrin-A5 induzierte Prozess der Akkumulationsstrukturbildung unabhängig von BDNF geschieht.

So führt also eine BDNF-Stimulation zu einer Translokation von P-ERK in den Zellkern, wohingegen unter Ephrin-A5 Applikation ein Translokationsvorgang nicht zu beobachten ist, es jedoch zu einer Akkumulation von P-ERK in den Neuriten kommt. Daten zu den Ephrin-A5 induzierten Akkumulationsstrukturen und der fehlenden P-ERK Translokation nach simultaner BDNF/ Ephrin-A5 Stimulation lassen vermuten, dass durch Ephrin-A5 P-ERK aus einem Speicher bereitgestellt wird, der unabhängig von BDNF ist. P-ERK aus diesem Speicher transloziert nach EphA-Rezeptoraktivierung nicht in den Zellkern, sondern verbleibt in den Neuriten und assoziiert mit dem EphA-Rezeptor (**Abb. 3.18**).

Die P-Erk Akkumulationen kolokalisieren mit EphA-Rezeptoren (**Abb. 3.18**). Diese wiederum kolokalisieren mit dem GTPase-aktivierende Protein Ras-GAP. Dieses überführt das kleine G-Protein Ras von seiner aktiven GTP-gebundenen Form in die inaktive GDP-gebundene Form. Aktiviertes Ras führt zu einer Aktivierung von Raf und weiterer MAP-Kinasen, was zu einer Aktivierung von Wachstums- und Differenzierungsprozessen führt. Durch Inaktivierung von Ras übernimmt Ras-GAP eine negativ regulatorische Funktion innerhalb des MAP-Kinase Signalweges. Ras-GAP wurde in Verbindung gebracht nach Rezeptoraktivierung durch Ephrin, die

MAPK ERK zu inhibieren (Elowe et al., 2001; Tong et al., 2003) (siehe 3.2.10). Ein möglicher molekularer Mechanismus wäre demzufolge die Rekrutierung von Ras-GAP nach EphA-Rezeptoraktivierung und folglich Inhibierung der MAP-Kinase ERK, woraufhin eine Translokation in den Zellkern durch BDNF nicht mehr erfolgen kann. Es wäre demzufolge denkbar, dass durch Überexpression von Ras oder die Verwendung von Ras-GAP siRNA, die BDNF-induzierte Phosphorylierung von ERK nicht mehr durch Ephrin-A5 unterdrückt werden kann.

4.1.3 Eine neue Funktion der vorwärts gerichteten EphA-Signaltransduktion: Beeinflussung der Genexpression

Es ist zu vermuten, dass die beschriebene Ephrin-A5-vermittelte Hemmung der BDNF-induzierten ERK-Aktivität im Folgenden die Genexpression beeinflusst (**Abb. 3.20**). Die MAP-Kinase ERK scheint hierbei partiell eine Rolle in dieser Interaktion zu spielen. Unter Verwendung eines konstitutiv aktiven MEK-Konstrukts blieb eine Unterdrückung der BDNF-induzierten Genantwort bei gleichzeitiger EphA-Rezeptoraktivierung aus (**Abb. 3.24**).

Die Aktivierung diverser Rezeptortyrosinkinasen, wie z.B. des BDNF-Rezeptors TrkB (Klein et al., 1991), kann die Transkriptionsaktivität von Genen beeinflussen. Bis dato konnte jedoch die EphA-Signaltransduktion nicht mit einer Beeinflussung der Genexpression in Verbindung gebracht werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung des EphA-Rezeptors zu einer Hemmung der BDNF-induzierten Genexpression führt (**Abb. 3.20**). Hierbei erweist sich SRF als unabdingbarer Transkriptionsfaktor für die Inhibierung der BDNF-vermittelten neuronalen IEG Antwort von *Egr-1*, *Egr-2* und *Arc* (**Abb. 3.20**). Es stellt sich nun die Frage, inwiefern die EphA-Signaltransduktion die axonale Wegfindung mittels Hemmung der BDNF-vermittelten IEG-Induktion beeinflusst? Es ist bekannt, dass IEGs wie *c-fos* und *Egr-1* neuronale Motilität beeinflussen (Jessen et al., 2001; Levkovitz et al., 2001). Somit könnte die BDNF-vermittelte Hochregulierung der IEGs zur fördernden Wirkung von BDNF auf die Neuriten- und Seitenverzweigungen führen (Lowenstein and Arsenault, 1996; Marler et al., 2008). Hierbei könnte die EphA-Rezeptoraktivierung durch Verminderung der IEG-Menge in einer Hemmung

der BDNF-induzierten Neuritenverzweigung resultieren. An dieser Stelle ist besonders *Arc* hervorzuheben, da dieses IEG die Dynamik des Aktinzytoskeletts beeinflusst. Erreicht wird dies z.B. durch die Inhibierung von Cofilin, ein Protein, das zur Bereitstellung von Aktin führt (Messaoudi et al., 2007; Bramham et al., 2008). Neben der BDNF-Signalweiterleitung wird durch EphA-Rezeptoraktivierung auch die FGF-Signaltransduktion inhibiert (Yue et al., 2008). Es liegt die Schlussfolgerung nahe, dass der auf die Genexpression inhibierende Effekt durch EphA-Rezeptoraktivierung, die Tyrosinkinaseaktivität in vielen biologischen Funktionsbereichen moduliert, z.B. in der synaptischen Plastizität und Ausbildung axonaler Verzweigungen (Marler et al., 2008). Neben der Unterdrückung der BDNF-induzierten Genexpression, zeigt die vorwärts gerichtete EphA-Signaltransduktion einen Effekt auf die Genexpression zytoskelettaler Gene, was potentiell in einer Repulsion des Wachstumskegels resultieren kann (*Tpm1, Tpm2, Actn1, Dnal1*; **Abb. 3.21 und 3.22**). So wird nach langanhaltender Ephrin-A5 Stimulation z.B. die mRNA von Tropomyosinen (*Tpm1, Tpm2*) hochreguliert (**Abb. 3.21 und 3.22**). Hierbei handelt es sich um Proteine, welche filamentöses Aktin (F-Aktin) stabilisieren.

Ein Anstieg der mRNA des zytoskelettalen Gens *Tpm* wäre folgendermaßen zu erklären: Es ist bekannt, dass Ephrin-A5 in einem neuronalen Wachstumskegelkollaps resultiert, was auf die vollständige Depolymerisation des Aktinzytoskeletts zurückzuführen ist (Dickson, 2001). Daher wäre eine Repression von *Tpm1/2* nach Ephrin-A5 Stimulation naheliegend, jedoch erfolgte durch eine langandauernde Ephrin-A5 Stimulation eine Hochregulierung. Um nun der anfänglichen Depolymerisation des Aktinzytoskeletts entgegenzuwirken und das Aktinzytoskelett zu stabilisieren, ist eine Erhöhung des F-Aktin stabilisierenden Gens Tropomyosin eine mögliche physiologische Konsequenz. Somit würde Tropomyosin dazu beitragen dem Ephrin-A5-induzierten transienten Wachstumskegelkollaps entgegenzuwirken, woraufhin es zu einer Erholung des kollabierten Wachstumskegels kommen kann.

Verglichen mit den IEGs (**Abb. 3.20**), ist die Veränderung der zytoskelettalen Gene schwächer. Hierbei ist jedoch anzumerken, dass die Grundmenge der zytoskelettalen Gene wesentlich höher ist als die der IEGs und damit eine Induktion/Repression wesentlich schwieriger zu erreichen ist. Der genaue Mechanismus, wie

diese Gene zu einer EphA-vermittelten axonalen Repulsion führen, ist in zukünftigen Experimenten zu klären.

4.1.4 Der SRF-Kofaktor MAL als mögliches Bindeglied der EphA-BDNF-Interaktion

Um die Wirkung der Lenkungsmoleküle Ephrin-A5 und BDNF auf eine SRF-induzierte Genexpression zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit neben biochemischen Versuchen und der Analyse auf mRNA Ebene auf ein weiteres experimentelles System zurückgegriffen. Hierbei handelt es sich um den Luziferasereporterassay unter Verwendung entsprechender Reportergenkonstrukte (Egr1-Luc, (TSm)₂, (Tmm)₂ und (mSm)₂; siehe **Abb. 3.26**). Eine Koapplikation von Ephrin-A5 und BDNF führt in Egr1-Luc elektroporierten Primärneuronen zu einer Inhibierung der BDNF-induzierten Reportergenaktivität (**Abb. 3.28B**). Diese Daten untermauern die in **Abb. 3.20** gezeigten Resultate, dass eine EphA-Rezeptoraktivierung die Neurotrophin-induzierte Genexpression der IEGs inhibieren kann.

Forschungsdaten belegen, dass die Transkriptionsaktivierung von SRF durch die MAP-Kinasen über den TCF-abhängigen Mechanismus erfolgt (siehe Einleitung 1.2.3) (Johansen and Prywes, 1994). Neuere Ergebnisse belegen jedoch, dass die Neurotrophin-vermittelte Transkription über den MAL-abhängigen Signalweg reguliert wird, was durch die Phosphorylierung von MAL über die MAP-Kinase ERK geschieht (Kalita et al., 2006; Wickramasinghe et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation mit BDNF zu einer raschen Induktion der Luziferaseaktivität sowohl in (TSm)₂ als auch (mSm)₂ elektroporierten Zellen führt, jedoch diese in (Tmm)₂-transfizierten Zellen unterbleibt (**Abb. 3.27**). Die Aktivierung des (TSm)₂-Konstrukts lässt hierbei auf eine Beteiligung des TCF und MAL-Signalweges schließen. Eine robuste Aktivierung in (mSm)₂-elektroporierten Zellen und das Ausbleiben einer Genexpressionsantwort in (Tmm)₂-transfizierten Zellen, lässt schlussfolgern, dass BDNF möglicherweise über die MAL-Signalkaskade SRF aktiviert. Kalita et al. (2006) konnte nicht ausschließen, dass eine Induktion der Luziferaseaktivität auf einem indirekten Effekt durch z.B. Aktivierung von SRF-

Partnerproteinen beruht. Die in der Diplomarbeit (Christin Meier, Universität Tübingen, 2007) erhaltenen Daten für *Srf*-defiziente Neurone, schließen einen solchen von Kalita et al. beschriebenen indirekten Effekt aus, da hier eine Transkriptionsaktivierung durch BDNF unterblieb.

Ephrin-A5-Fc stimulierte Neurone wiesen eine schwächere Regulierung der Genexpression auf, als nach Stimulation mit dem Neurotrophin. In allen drei Reportergenkonstrukten ((TSm)₂, (Tmm)₂ und (mSm)₂) war eine leichte Abnahme der Luziferaseaktivität zu verzeichnen (**Abb. 3.27**). Dieses Resultat lässt auf eine Beteiligung des TCF-Signalweges schließen und zieht auch eine mögliche Beteiligung MAL-Signalweges in Betracht. Es kann auf eine SRF-abhängige Regulierung der Transkriptionsaktivität von *c-fos* geschlossen werden, da in SRF-defizienten Primärkulturen eine Stimulation mit BDNF oder Ephrin-A5 in keinem der Konstrukte zu einer Veränderung der Luziferaseaktivität führt (Daten siehe Diplomarbeit Christin Meier, Universität Tübingen).

4.1.5 Konsequenz einer BDNF-Ephrin-A5 Interaktion auf die axonale Lenkung hippocampaler Neurone

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der Interaktion der EphA- und Neurotrophinsignaltransduktion auf hippocampale Neurone untersucht. EphA-Rezeptoraktivierung führte in kultivierten Primärneuronen zu einer Hemmung der BDNF-induzierten Wachstumskegelmotilität. In organotypischen Schnittkulturen des Hippocampus führte sowohl die Applikation von BDNF als auch von Ephrin-A5 zu einer Defaszikulierung sowie einem fehlgeleiteten Wachstum hippocampaler Moosfasern (**Abb. 3.13**). Proteinbiochemische Untersuchungen ergaben, dass die MAPK ERK durch beide Lenkungsmoleküle reguliert wird, jedoch mit unterschiedlicher Wirkungsweise. Während es durch BDNF zu einer Aktivierung von ERK kommt, erfolgt durch EphA-Rezeptoraktivierung zu einer Inhibierung der BDNF-induzierten ERK Aktivierung sowie Translokation in den Zellkern. Im Rahmen dieser Dissertation wurden - mittels Untersuchungen auf mRNA Ebene - erste Hinweise geliefert, dass die vorwärts gerichtete EphA-Signaltransduktion Einfluss auf die Genexpression nehmen kann. So bewirkt die Bindung von Ephrin-A5 an den EphA-

Rezeptor eine Unterdrückung der BDNF-stimulierten Induktion von IEGs. Neben der Genrepression kommt es durch EphA-Rezeptoraktivierung zu einer Induktion der Expression zytoskelettaler Gene, welche relevant für die Formgebung der Neuronen während der axonalen Lenkung sein könnten. Letztendlich weisen die Daten dieser Arbeit darauf hin, dass durch die Lenkungsmoleküle BDNF und Ephrin-A5 herbeigeführte neuronale Änderungen SRF benötigt wird um eine Funktionalität zu gewährleisten. Gleiches gilt für die Reporterstudien (siehe **Abb. 3.20**). Die simultane Stimulation von Ephrin-A5 und BDNF führt zu einer Inhibierung der Neurotrophin-induzierten SRF-abhängigen Transkription des Reportergens. Die Inhibierung der MAP-Kinase ERK durch Ephrin-A5 könnte, wie unter **4.1.4** beschrieben, über eine TCF- und MAL-abhängigen Verminderung der SRE-vermittelten Transkription erreicht werden. BDNF hingegen erhöht die ERK-Aktivität. Aus den in dieser Arbeit vorliegenden Daten geht hervor, dass BDNF das Zytoskelett beeinflussende IEG *Arc* induziert (**Abb. 3.20**). Dieser Effekt der BDNF-induzierten Aktivierung von *Arc* geht Hand in Hand mit zuvor publizierten Forschungsdaten einher (Bramham et al., 2008). Bramham et al. konnte zudem zeigen, dass die Aktivierung von *Arc* durch das Neurotrophin letztendlich in einer Stabilisierung des Aktinzytoskeletts resultiert. Eine denkbare Folge des inhibierenden Effekts von Ephrin-A5 auf die BDNF-induzierten ERK-Aktivität, ist eine Hemmung der Genexpression von *Arc*. Das wiederum hätte eine Destabilisierung des Aktinzytoskeletts und damit einen Wachstumskegellkollaps zur Folge. In **Abb. 4.1** dargestellt, ergibt sich aus den Daten der vorliegenden Arbeit ein mögliches Modell zur Erklärung der molekularen Wirkungsweise, wie Ephrin-A5 mit der Neurotrophin-induzierten Signalweiterleitung interagiert (siehe **Abb. 4.2**).

Inwiefern ein kausaler Zusammenhang zwischen der Ephrin-A5 vermittelten Hemmung der BDNF-induzierten Wachstumskegeldynamik, der MAP-Kinase ERK und dessen Translokation in den Zellkern sowie dem Ablauf von Genexpressionsprogrammen herrscht, konnte in dieser Arbeit nicht eindeutig gezeigt werden. Der genannten Sachverhalte können durchaus miteinander in Verbindung stehen. Jedoch ist auch in Betracht zu ziehen, dass die Stimulus-vermittelte Änderung der Wachstumskegeldynamik durch lokale Transkriptions- und Translationsprozesse innerhalb des Wachstumskegels erfolgen kann und keiner Signalweiterleitung in das Soma des Neuron bedarf. Hierzu finden sich mehrere

wissenschaftliche Publikationen, die einen solchen Prozess mittels lokal translaterter mRNA beschreiben (Lin and Holt, 2007; Mikl et al., 2010; Sasaki et al., 2010; Yoon et al., 2009).

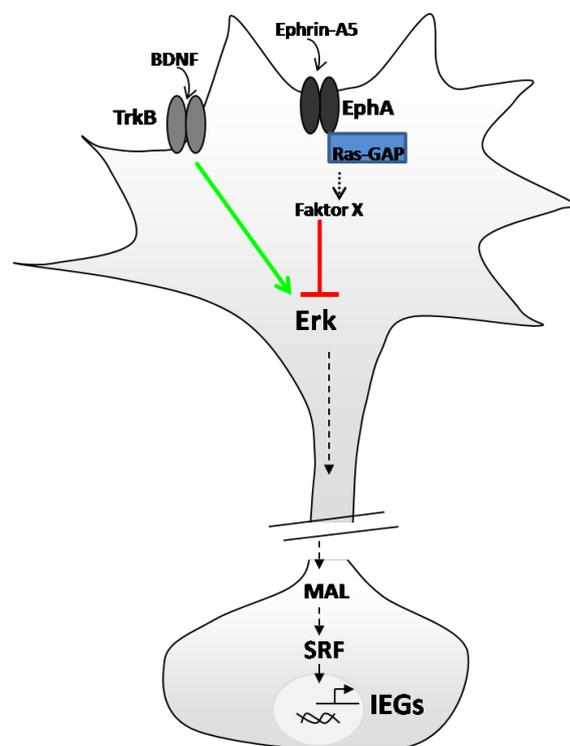


Abb. 4.2 Mögliches Modell einer BDNF-Ephrin-A5 Interaktion

Die Stimulation von BDNF führt zu einer Aktivierung von ERK und Aktivierung des SRF Kofaktors MAL. Die gestrichelte Linie weist darauf hin, dass der genaue Mechanismus noch ungeklärt ist. MAL wiederum kann SRF aktivieren, was zur Transkription von z.B. IEGs führt. EphA-Rezeptoraktivierung durch Ephrin-A5 führt zu einer Inhibierung von ERK, vermutlich über die Rekrutierung von Ras-GAP. Die gestrichelte Linie weist auch hier auf einen noch ungeklärten Mechanismus hin. Die Beteiligung eines unbekanntens Faktors (Faktor X) ist sehr wahrscheinlich. Die Hemmung von ERK führt zu einer Repression der BDNF-vermittelten Transkription.

4.2 Die Rolle von SRF in der hippocampalen Entwicklung

Forschungsdaten belegen, dass SRF für die Entwicklung des Hippocampus notwendig ist (Knoll et al., 2006; Stritt and Knoll, 2010). So führt eine neuronenen- und vorderhirnspezifische Deletion des Transkriptionsfaktors zu einem fehlerhaften

Aufbau hippocampaler Schichten (Stritt and Knoll, 2010) und einer Fehlsteuerung der Moosfaseraxone (Knoll et al., 2006). Bei letzterem wandern die Axone nicht wie in der wildtypischen Situation oberhalb der CA3-Zellkörperschicht, sondern innervieren das *Stratum pyramidale*. Im adulten murinen Hippocampus ist SRF ein wichtiger Faktor für Lern- und Gedächtnisvorgänge sowie synaptische Plastizität (Etkin et al., 2006; Ramanan et al., 2005). Ursache der fehlgeleiteten Moosfasern können wie unter 3.1.1 beschrieben u.a. auf axonaler Seite (z.B. fehlerhafte Rezeptorexpression) oder in der Umgebung (z.B. veränderte Expression und Verteilung von Zelladhäsions- oder Lenkungsmolekülen) liegen.

Innerhalb dieser Arbeit konnten zum einen mittels RT-PCR und *in-situ* Hybridisierungen verschiedene SRF-Zielgene in Verbindung mit dem in *Srf*-Mutanten beobachteten Defekt der hippocampalen Moosfaserwegfindung gebracht werden (Abb. 3.1 und 3.2). Zum anderen offenbarten organotypische hippocampale Schnittkulturen ein verändertes Migrationsverhalten der Zellkörper in frühen hippocampalen Entwicklungsstadien SRF-defizienter Tiere innerhalb der CA3-Region (Abb. 3.5 und 3.6).

Neben Lenkungsmolekülen und dem Transkriptionsfaktor SRF spielen Zelladhäsionsmoleküle eine ebenso maßgebliche Rolle an der morphologischen und funktionellen Integrität hippocampaler Moosfaseraxone (Cremer et al., 2000; Knoll and Nordheim, 2009). So konnte gezeigt werden, dass eine Deletion des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls NCAM zu einer fehlerhaften Faszikulierung, Lenkung und Innervation der Moosfasern sowie einer ektopischen Synaptogenese führt (Seki and Rutishauser, 1998). Hierbei ist anzumerken, dass der Phänotyp NCAM-defizienter Mäuse stark dem von SRF-defizienten Mäusen ähnelt. Auch hier kommt es zu einem fehlerhaften Eintreten der Moosfasern in die CA3-Zellkörperschicht (Cremer et al., 1997). Eines der in dieser Arbeit untersuchte Protein ist Glycam1, welches ebenso wie NCAM ein Zelladhäsionsmolekül darstellt. Untersuchungen auf mRNA Ebene ergaben, dass dieses Molekül in den Hippocampi SRF-defizienter Mäuse um den Faktor 4,5 höher ist als in wildtypischen Kontrolltieren (Abb. 3.1). Bisherige Daten verweisen lediglich auf eine Bindungsfunktion an Leukozyten über L-Selectin (Rosen et al., 1997). Daten dieser Arbeit (Abb. 3.1), sowie Genexpressionskartierungen (www.brain-map.org) weisen jedoch auf eine hohe Expression von Glycam1 innerhalb des Hippocampus, sowohl

in der CA3-Region als auch im Gyrus dentatus. Dieser Faktor ermöglicht die Leukozytenbindung wie o.g. durch Bindung an L-Selectin. Auch in Studien dieser vorliegenden Arbeit kommt ein Mitglied der Selectinfamilie - namentlich P-Selectin - als potentieller Kandidat für den Moosfaserphänotyp in *Srf*-Mutanten in Betracht. Dieses Molekül ist im Hippocampus von Wildtypmäusen besonders stark in der CA3-Region exprimiert (**Abb. 3.2**). Hierbei könnte Glycam1 den Liganden für das als Rezeptor agierende P-Selectin darstellen. Daten dieser Arbeit zeigen, dass P-Selectin in SRF-defizienten Hippocampi stark herunterreguliert ist (**Abb. 3.1**). Es ist denkbar, dass durch eine Hochregulierung von Glycam1 in *Srf*-Mutanten der Herunterregulierung von P-Selectin entgegengewirkt wird. Dies würde jedoch auch bedeuten, dass P-Selectin und Glycam1 nicht an der Moosfaserfehlleitung in SRF-defizienten Mäusen beteiligt sind. Noch andere unbekannte Faktoren in der Umgebung, spezifisch das *Stratum pyramidale* der CA3-Region, sind also als eine mögliche Ursache für die Fehlleitung der Moosfaseraxone.

Daten der **Abb. 3.5** und **Abb. 3.6** weisen zudem auf eine mögliche Migrationsstörung granulärer und pyramidaler Zellkörper des Hippocampus hin. So ist in *Srf*-Mutanten bereits in sehr frühen Entwicklungsstadien (P3) eine disperse Zellkörperschicht zu erkennen. Auch scheint es, als verläuft die Entwicklung des Gyrus dentatus und der CA-Region in Mutanten verspätet ab. Wie in der Einleitung beschreiben (siehe 1.2.4.2) übernimmt SRF als Regulator der Aktin-Dynamik (Schratt et al., 2002; Stern et al., 2009) wichtige Funktionen in der neuronalen Zellmigration (Alberti et al., 2005), axonalen Lenkung und Wachstumskegelmotilität (Knoll et al., 2006). So führt das Fehlen von SRF zu massiven Migrationsdefekten neuronaler Vorläuferzellen des *rostral migratory stream* (RMS) (Alberti et al., 2005). Es war zu beobachten, dass die Vorläuferzellen nicht wie üblich von der Subventrikularzone (SVZ) in den olfaktorischen Bulbus wanderten, sondern in der SVZ verweilten. Auch die Entwicklung des Gyrus dentatus geht aus Vorläuferzellen der Subgranulären Zone (SGZ) des Gyrus dentatus (DG) hervor (ausführliche Erläuterung siehe 1.1.4.3). Die Generierung von Körnerzellen, aus denen die Moosfaseraxone hervorgehen, werden noch während der ganzen adulten Phase generiert. Da auch für diesen Vorgang, ebenso wie bei der Ausbildung des RMS, ein zeitlich und räumlich exaktes Migrationsverhalten benötigt wird, liegt ein Migrationsdefekt in *Srf*-Mutanten nahe. Das wiederum könnte zu einer Fehlpositionierung von Körner- und

Pyramidalzellneuronen führen, was eine fehlerhaften Moosfaserwegfindung zur Folge haben kann. Als mögliche Ursache für diesen Defekt wurden in der Arbeit von Alberti et al. u.a. eine Veränderung in der Genexpression zytoskelettaler Gene in Betracht gezogen, welche in SRF-defizienten Mäusen herunterreguliert waren. Auch eine verstärkte Inhibierung von Cofilin wurde ebenso als möglicher Grund für die Migrationsdefekte genannt (Alberti et al., 2005). So liegt es nahe, dass aufgrund ähnlicher Entstehungshintergründe des RMS und des Hippocampus, das Fehlen von SRF in die Aktindynamik eingreift und es letztendlich dadurch zu einer fehlerhaften Positionierung hippocampaler Moosfasern führen kann.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass erst das Zusammenspiel von Lenkungsmolekülen, Zelladhäsionsmolekülen und Transkriptionsfaktoren eine korrekte Entwicklung der hippocampalen Moosfasern ermöglicht.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass SRF ein wichtiger Regulator der hippocampalen Entwicklung ist, wobei der spezielle Fokus auf der Moosfaserentwicklung lag. Die erhaltenen Daten deuten darauf hin, dass es durch eine Deletion von SRF zu einer Störung der Aktinzytoskelettdynamik kommt. Als Folge dessen kommt es zu Migrationsdefekten der Zellkörper- und Pyramidalneurone, was schließlich zu einer Fehlleitung hippocampaler Moosfaseraxone führt. Ebenso wurde SRF eine Beeinflussung von Zelladhäsionsmolekülen zugewiesen, was als weitere Ursache für die Fehlsteuerung des Moosfasertraktes in Betracht gezogen wurde.

Axonale Lenkungsmoleküle spielen für die korrekte Verschaltung neuronaler Netzwerke eine unabdingbare Rolle. Die abgestimmte Wirkung attraktiver und repulsiver Moleküle ermöglicht dem axonalen Wachstumskegel sein finales Zielgebiet zu erreichen, wo schließlich Synapsen ausgebildet werden können. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, wie Wachstumskegel die unterschiedlichen Instruktionen des attraktiven Lenkungsmoleküls BDNF und des vornehmlich repulsiv wirkenden Ephrin-A5 integrieren und welchen Effekt diese Interaktion auf die axonale Lenkung hippocampaler Neurone hat.

In-vivo nahe Experimente deuten darauf hin, dass BDNF und Ephrin-A5 eine Rolle in der hippocampalen Moosfaserwegfindung spielen. Des Weiteren enthüllten *in-vitro* Daten, dass Ephrin-A5 der BDNF-induzierten Wachstumskegelmotilität entgegenwirkt. In SRF-defizienten Neuronen unterblieb dieser Effekt auf die Dynamik des Wachstumskegels hippocampaler Neurone. Western Blot Analysen zeigten, dass Ephrin-A5 die BDNF-induzierte ERK-Aktivität hemmt. Die Neurotrophin-induzierte Aktivierung des MAPK-Signalweges resultierte in einer Translokation von phosphoryliertem ERK in den Zellkern. Dieser Translokationsprozess blieb interessanter Weise nach Applikation von Ephrin-A5 aus. Durch Studien auf Genexpressionsebene konnte herausgefunden werden, dass die durch BDNF ausgelöste Signalweiterleitung in einer SRF-abhängigen Induktion von

IEGs, z.B. *c-fos*, *Egr1* und *Arc*, resultiert. Ephrin-A5 blockiert diesen BDNF-induzierten Effekt auf die Genexpression der IEGs.

Zusammengefasst deuten die vorliegenden Daten auf eine Interaktion des EphA-Rezeptors und der Neurotrophine auf der Ebene der MAPK Signalweiterleitung sowie Genexpression. Diese Interaktion könnte nicht nur für die Entwicklung des zentralen Nervensystems relevant sein, sondern auch für andere bereits bekannte physiologische und pathophysiologische Funktionen der Ephrine und Neurotrophine, wie z.B. in der Angiogenese (Kraemer and Hempstead, 2003) oder auch Epilepsie (Gall and Lauterborn, 1992).

6 Summary

This work proves SRF as an important regulator of hippocampal development particular focussing on mossy fibre development. The data suggests a disorganisation of actin cytoskeletal dynamics due to deletion of SRF. As a consequence granule and pyramidal neurons show defects in migratory behaviour leading to misguided mossy fibre axons. Furthermore SRF was assigned to influence cell adhesion molecules, which can be seen as an additional cause for the process of misguided mossy fibre tract.

For the precise wiring of neuronal circuits, axon guidance cues play a pivotal role. The concerted action of repulsive and attractive molecules enables the axonal growth cone to reach its final target, where then synapses can be formed. With this work I aimed to investigate how growth cones integrate opposing signaling instructions by the attractive guidance cue brain derived neurotrophic factor (BDNF) and mainly repulsive acting ephrin-A5 and its effects on hippocampal axon guidance.

In vivo like experiments suggest a role of BDNF and ephrin-A5 in hippocampal mossy fibre guidance. Furthermore *in vitro* data revealed a counteracting capacity of BDNF-evoked growth cone motility by ephrin-A5. Those alterations on growth cone dynamics failed in SRF-depleted hippocampal neurons. Western blot analysis showed that ephrin-A5 inhibited BDNF-induced ERK-phosphorylation. Neurotrophin-induced activation of MAPK signaling pathway resulted in translocation of phosphorylated ERK into the nucleus. Interestingly, this translocation was prevented upon simultaneous application of ephrin-A5. Studies on gene expression level demonstrated that signaling propagation upon BDNF stimulation resulted in SRF-dependent IEG induction e.g. of *c-fos*, *Egr1* and *Arc*. Ephrin-A5 antagonized this BDNF-evoked gene expression of IEGs.

Taken together, the data suggests an interaction of EphA receptor and neurotrophins converging at the level of MAPK signaling and neuronal gene expression. This interaction might not be only relevant for the development of the

nervous system but also for other physiological and pathological functions known to be regulated by neurotrophins and ephrins, as angiogenesis (Kraemer and Hempstead, 2003) or epilepsy (Gall and Lauterborn, 1992).

7 Abkürzungsverzeichnis

β-Me	beta-Mercaptoethanol
Abb.	Abbildung
α	anti
<i>Acta2</i>	<i>Actin, alpha2</i>
<i>Arc</i>	<i>activity regulated cytoskeletal-associated protein</i>
AS	Aminosäure
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
Bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin)
C4	<i>complement C4</i>
CA-Region	<i>Cornu Ammonis</i> (Ammonshorn)
cDNA	komplementäre DNA
<i>c-fos</i>	<i>cellular FBJ osteosarcoma oncogene</i>
CRE	<i>cyclization recombination</i>
CREB	<i>cAMP responsive element binding protein</i>
Ct-Wert	<i>cycle threshold</i> (Schwellenwert)
<i>Cyr61</i>	<i>cysteine-rich, angiogenic inducer, 61</i>
d	Tag
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DG-Region	Gyrus Dentaus
Dil	1,1',di-octadecyl-3,3,3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
div	<i>days in vitro</i> (Tage in vitro)
dN ₆	<i>Random Hexamers</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonucleinsäure)
<i>Dnalc1</i>	<i>dynein, axonemal, light chain 1</i>
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat

DUSP	<i>dual specificity phosphatase 5</i>
E17.5	embryonaler Tag 17.5
<i>Egr1</i>	<i>early growth response gene-1</i>
<i>Egr-2</i>	<i>early growth response gene-2</i>
Elk-1	<i>Ets-like transcription factor</i>
EphA4	Eph-Rezeptor A4
EphA7	Eph-Rezeptor A7
EphB2	Eph-Rezeptor B2
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
EtOH	Ethanol
Ets	<i>E-twenty-six</i>
F-Aktin	filamentöses Aktin
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
<i>Flna</i>	Filamin-alpha
Fw	<i>forward</i> (vorwärts)
G-Aktin	globuläres Aktin
GAP	<u>G</u> T <u>P</u> -aktivierendes <u>P</u> rotein
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (grün fluoreszierendes Protein)
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEK293	<u>h</u> uman <u>e</u> m <u>b</u> ryonic <u>k</u> idney 293 cells
IEGs	<i>immediate early genes</i>
IgG	Immunglobulin G
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KO	<i>knock out</i>
LTD	<i>long term depression</i>
LTP	<i>long term potentiation</i>
M	Mol

MADS	<i>MCM1, Agamous, Deficiens, serum response factor</i>
MAL/ MKL1	<i>megakaryoblastic leukemia 1</i>
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
mg	Milligramm
min	Minuten
mind.	mindestens
MKL2	<i>megakaryoblastic leukemia 2</i>
ml	Milliliter
M-MLV RT	<i>Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase</i>
mm	Millimeter
mRNA	<i>messengerRNA</i>
MRTF	<i>myocardin-related transcription factors</i>
Net	<i>new ets transcription factor</i>
NLS	<i>nuclear localisation sequence (Kernlokalisationssequenz)</i>
Nm	Nanometer
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i> (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)
P-	phosphoryliertes
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PLL	Poly-L-Lysin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
rel.	relative
rev	<i>reverse</i> (rückwärts)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
ROCK	<i>Rho associated kinase</i> , Rho-assoziierte Serin-Threonin-Kinase
rpm	<i>rounds per minutes</i> (Umdrehungen pro Minute)
sec	Sekunden
Sema	Semaphorin
SHP2	SH2 Domäne-beinhaltende Protein Tyrosine Phosphatase
Ship2	SH2 Domäne-beinhaltende Inositolphosphatase
SRE	<i>serum response element</i>

SRF	<i>serum response factor</i>
Str.l	<i>Stratum lucidum</i>
Str.o	<i>Stratum oriens</i>
Str.p	<i>Stratum pyramidale</i>
Str.r	<i>Stratum radiatum</i>
t	Zeit
TCF	<i>ternary complex factor</i>
<i>Tpm1</i>	<i>tropomyosin 1, alpha</i>
<i>Tpm2</i>	<i>tropomyosin 2, beta</i>
U	units (Einheiten)
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolettstrahlung
v/v	<i>volume per volume</i>
V	Volt
VP16	Virales Protein 16
w/o	<i>without</i> (ohne)
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Adams, R.H., Wilkinson, G.A., Weiss, C., Diella, F., Gale, N.W., Deutsch, U., Risau, W., and Klein, R. (1999). Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev* 13, 295-306.
2. Akaneya, Y., Sohya, K., Kitamura, A., Kimura, F., Washburn, C., Zhou, R., Ninan, I., Tsumoto, T., and Ziff, E.B. (2010). Ephrin-A5 and EphA5 interaction induces synaptogenesis during early hippocampal development. *PLoS One* 5, e12486.
3. Alberti, S., Krause, S.M., Kretz, O., Philippar, U., Lemberger, T., Casanova, E., Wiebel, F.F., Schwarz, H., Frotscher, M., Schutz, G., *et al.* (2005). Neuronal migration in the murine rostral migratory stream requires serum response factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 6148-6153.
4. Allen, S.J., Crown, S.E., and Handel, T.M. (2007). Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol* 25, 787-820.
5. Altman, J., and Bayer, S.A. (1990). Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J Comp Neurol* 301, 365-381.
6. Amaral, D.G., and Witter, M.P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31, 571-591.
7. Angstenberger, M., Wegener, J.W., Pichler, B.J., Judenhofer, M.S., Feil, S., Alberti, S., Feil, R., and Nordheim, A. (2007). Severe intestinal obstruction on induced smooth muscle-specific ablation of the transcription factor SRF in adult mice. *Gastroenterology* 133, 1948-1959.
8. Aoki, M., Yamashita, T., and Tohyama, M. (2004). EphA receptors direct the differentiation of mammalian neural precursor cells through a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry* 279, 32643-32650.
9. Arevalo, J.C., Waite, J., Rajagopal, R., Beyna, M., Chen, Z.Y., Lee, F.S., and Chao, M.V. (2006). Cell survival through Trk neurotrophin receptors is differentially regulated by ubiquitination. *Neuron* 50, 549-559.
10. Arevalo, J.C., and Wu, S.H. (2006). Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell Mol Life Sci* 63, 1523-1537.

11. Arsenian, S., Weinhold, B., Oelgeschlager, M., Ruther, U., and Nordheim, A. (1998). Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis. *Embo J* 17, 6289-6299.
12. Bading, H., Ginty, D.D., and Greenberg, M.E. (1993). Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways. *Science* 260, 181-186.
13. Bagri, A., Cheng, H.J., Yaron, A., Pleasure, S.J., and Tessier-Lavigne, M. (2003). Stereotyped pruning of long hippocampal axon branches triggered by retraction inducers of the semaphorin family. *Cell* 113, 285-299.
14. Ben-Ari, Y., and Represa, A. (1990). Brief seizure episodes induce long-term potentiation and mossy fibre sprouting in the hippocampus. *Trends in neurosciences* 13, 312-318.
15. Besnard, A., Galan-Rodriguez, B., Vanhoutte, P., and Caboche, J. (2011). Elk-1 a transcription factor with multiple facets in the brain. *Front Neurosci* 5, 35.
16. Bonni, A., Brunet, A., West, A.E., Datta, S.R., Takasu, M.A., and Greenberg, M.E. (1999). Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 286, 1358-1362.
17. Borasio, G.D., John, J., Wittinghofer, A., Barde, Y.A., Sendtner, M., and Heumann, R. (1989). ras p21 protein promotes survival and fiber outgrowth of cultured embryonic neurons. *Neuron* 2, 1087-1096.
18. Bramham, C.R., Worley, P.F., Moore, M.J., and Guzowski, J.F. (2008). The immediate early gene *arc/arg3.1*: regulation, mechanisms, and function. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 11760-11767.
19. Bruckner, K., Pasquale, E.B., and Klein, R. (1997). Tyrosine phosphorylation of transmembrane ligands for Eph receptors. *Science* 275, 1640-1643.
20. Brunet, A., Roux, D., Lenormand, P., Dowd, S., Keyse, S., and Pouyssegur, J. (1999). Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *The EMBO journal* 18, 664-674.
21. Buchwalter, G., Gross, C., and Wasyluk, B. (2004). Ets ternary complex transcription factors. *Gene* 324, 1-14.

22. Casanova, E., Fehsenfeld, S., Mantamadiotis, T., Lemberger, T., Greiner, E., Stewart, A.F., and Schutz, G. (2001). A CamKIIalpha iCre BAC allows brain-specific gene inactivation. *Genesis* 31, 37-42.
23. Caunt, C.J., Armstrong, S.P., Rivers, C.A., Norman, M.R., and McArdle, C.A. (2008). Spatiotemporal regulation of ERK2 by dual specificity phosphatases. *The Journal of biological chemistry* 283, 26612-26623.
24. Cen, B., Selvaraj, A., and Prywes, R. (2004). Myocardin/MKL family of SRF coactivators: key regulators of immediate early and muscle specific gene expression. *J Cell Biochem* 93, 74-82.
25. Chai, J., and Tarnawski, A.S. (2002). Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing. *J Physiol Pharmacol* 53, 147-157.
26. Charvet, C., Houbron, C., Parlakian, A., Giordani, J., Lahoute, C., Bertrand, A., Sotiropoulos, A., Renou, L., Schmitt, A., Melki, J., *et al.* (2006). New role for serum response factor in postnatal skeletal muscle growth and regeneration via the interleukin 4 and insulin-like growth factor 1 pathways. *Molecular and cellular biology* 26, 6664-6674.
27. Chedotal, A., and Richards, L.J. (2010). Wiring the brain: the biology of neuronal guidance. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a001917.
28. Chen, H., Bagri, A., Zupicich, J.A., Zou, Y., Stoeckli, E., Pleasure, S.J., Lowenstein, D.H., Skarnes, W.C., Chedotal, A., and Tessier-Lavigne, M. (2000). Neuropilin-2 regulates the development of selective cranial and sensory nerves and hippocampal mossy fiber projections. *Neuron* 25, 43-56.
29. Cheng, H.J., Nakamoto, M., Bergemann, A.D., and Flanagan, J.G. (1995). Complementary gradients in expression and binding of ELF-1 and Mek4 in development of the topographic retinotectal projection map. *Cell* 82, 371-381.
30. Chilton, J.K. (2006). Molecular mechanisms of axon guidance. *Dev Biol* 292, 13-24.
31. Ciossek, T., Millauer, B., and Ullrich, A. (1995). Identification of alternatively spliced mRNAs encoding variants of MDK1, a novel receptor tyrosine kinase expressed in the murine nervous system. *Oncogene* 10, 97-108.
32. Cohen-Cory, S., and Fraser, S.E. (1995). Effects of brain-derived neurotrophic factor on optic axon branching and remodelling in vivo. *Nature* 378, 192-196.
33. Conner, J.M., Lauterborn, J.C., Yan, Q., Gall, C.M., and Varon, S. (1997). Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal

- adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17, 2295-2313.
34. Cremer, H., Chazal, G., Golidis, C., and Represa, A. (1997). NCAM is essential for axonal growth and fasciculation in the hippocampus. *Mol Cell Neurosci* 8, 323-335.
 35. Cremer, H., Chazal, G., Lledo, P.M., Rougon, G., Montaron, M.F., Mayo, W., Le Moal, M., and Abrous, D.N. (2000). PSA-NCAM: an important regulator of hippocampal plasticity. *Int J Dev Neurosci* 18, 213-220.
 36. Dalton, S., Marais, R., Wynne, J., and Treisman, R. (1993). Isolation and characterization of SRF accessory proteins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 340, 325-332.
 37. Danzer, S.C., Crooks, K.R., Lo, D.C., and McNamara, J.O. (2002). Increased expression of brain-derived neurotrophic factor induces formation of basal dendrites and axonal branching in dentate granule cells in hippocampal explant cultures. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 9754-9763.
 38. Davis, R.J. (1995). Transcriptional regulation by MAP kinases. *Mol Reprod Dev* 42, 459-467.
 39. Davis, S., Gale, N.W., Aldrich, T.H., Maisonpierre, P.C., Lhotak, V., Pawson, T., Goldfarb, M., and Yancopoulos, G.D. (1994). Ligands for EPH-related receptor tyrosine kinases that require membrane attachment or clustering for activity. *Science* 266, 816-819.
 40. Davy, A., Gale, N.W., Murray, E.W., Klinghoffer, R.A., Soriano, P., Feuerstein, C., and Robbins, S.M. (1999). Compartmentalized signaling by GPI-anchored ephrin-A5 requires the Fyn tyrosine kinase to regulate cellular adhesion. *Genes & development* 13, 3125-3135.
 41. Derijck, A.A., Van Erp, S., and Pasterkamp, R.J. (2010). Semaphorin signaling: molecular switches at the midline. *Trends in cell biology* 20, 568-576.
 42. Dickson, B.J. (2001). Rho GTPases in growth cone guidance. *Curr Opin Neurobiol* 11, 103-110.
 43. Dickson, B.J. (2002). Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* 298, 1959-1964.
 44. Dodelet, V.C., and Pasquale, E.B. (2000). Eph receptors and ephrin ligands: embryogenesis to tumorigenesis. *Oncogene* 19, 5614-5619.

45. Drescher, U., Kremoser, C., Handwerker, C., Loschinger, J., Noda, M., and Bonhoeffer, F. (1995). In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases. *Cell* 82, 359-370.
46. Egea, J., and Klein, R. (2007). Bidirectional Eph-ephrin signaling during axon guidance. *Trends Cell Biol* 17, 230-238.
47. Elowe, S., Holland, S.J., Kulkarni, S., and Pawson, T. (2001). Downregulation of the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway by the EphB2 receptor tyrosine kinase is required for ephrin-induced neurite retraction. *Mol Cell Biol* 21, 7429-7441.
48. Engelhardt, B. (2008). Immune cell entry into the central nervous system: involvement of adhesion molecules and chemokines. *J Neurol Sci* 274, 23-26.
49. Etkin, A., Alarcon, J.M., Weisberg, S.P., Touzani, K., Huang, Y.Y., Nordheim, A., and Kandel, E.R. (2006). A role in learning for SRF: deletion in the adult forebrain disrupts LTD and the formation of an immediate memory of a novel context. *Neuron* 50, 127-143.
50. Faulkner, R.L., Low, L.K., and Cheng, H.J. (2007). Axon pruning in the developing vertebrate hippocampus. *Dev Neurosci* 29, 6-13.
51. Finkbeiner, S., Tavazoie, S.F., Maloratsky, A., Jacobs, K.M., Harris, K.M., and Greenberg, M.E. (1997). CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron* 19, 1031-1047.
52. Fitzgerald, M., Buckley, A., Lukehurst, S.S., Dunlop, S.A., Beazley, L.D., and Rodger, J. (2008). Neurite responses to ephrin-A5 modulated by BDNF: evidence for TrkB-EphA interactions. *Biochemical and biophysical research communications* 374, 625-630.
53. Fleige, A., Alberti, S., Grobe, L., Frischmann, U., Geffers, R., Muller, W., Nordheim, A., and Schippers, A. (2007). Serum response factor contributes selectively to lymphocyte development. *The Journal of biological chemistry* 282, 24320-24328.
54. Forcet, C., Stein, E., Pays, L., Corset, V., Llambi, F., Tessier-Lavigne, M., and Mehlen, P. (2002). Netrin-1-mediated axon outgrowth requires deleted in colorectal cancer-dependent MAPK activation. *Nature* 417, 443-447.
55. Forster, E., Zhao, S., and Frotscher, M. (2006). Laminating the hippocampus. *Nat Rev Neurosci* 7, 259-267.

56. Franco, C.A., Mericskay, M., Parlakian, A., Gary-Bobo, G., Gao-Li, J., Paulin, D., Gustafsson, E., and Li, Z. (2008). Serum response factor is required for sprouting angiogenesis and vascular integrity. *Dev Cell* 15, 448-461.
57. Frisen, J., Yates, P.A., McLaughlin, T., Friedman, G.C., O'Leary, D.D., and Barbacid, M. (1998). Ephrin-A5 (AL-1/RAGS) is essential for proper retinal axon guidance and topographic mapping in the mammalian visual system. *Neuron* 20, 235-243.
58. Gale, N.W., Holland, S.J., Valenzuela, D.M., Flenniken, A., Pan, L., Ryan, T.E., Henkemeyer, M., Strebhardt, K., Hirai, H., Wilkinson, D.G., *et al.* (1996). Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis. *Neuron* 17, 9-19.
59. Gall, C., and Lauterborn, J. (1992). The dentate gyrus: a model system for studies of neurotrophin regulation. *Epilepsy Res Suppl* 7, 171-185.
60. Gao, W.Q., Shinsky, N., Armanini, M.P., Moran, P., Zheng, J.L., Mendoza-Ramirez, J.L., Phillips, H.S., Winslow, J.W., and Caras, I.W. (1998). Regulation of hippocampal synaptic plasticity by the tyrosine kinase receptor, REK7/EphA5, and its ligand, AL-1/Ephrin-A5. *Mol Cell Neurosci* 11, 247-259.
61. Gehler, S., Shaw, A.E., Sarmiere, P.D., Bamburg, J.R., and Letourneau, P.C. (2004). Brain-derived neurotrophic factor regulation of retinal growth cone filopodial dynamics is mediated through actin depolymerizing factor/cofilin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24, 10741-10749.
62. Geneste, O., Copeland, J.W., and Treisman, R. (2002). LIM kinase and Diaphanous cooperate to regulate serum response factor and actin dynamics. *The Journal of cell biology* 157, 831-838.
63. Geraldo, S., and Gordon-Weeks, P.R. (2009). Cytoskeletal dynamics in growth-cone steering. *Journal of cell science* 122, 3595-3604.
64. Giovane, A., Pintzas, A., Maira, S.M., Sobieszczuk, P., and Wasylyk, B. (1994). Net, a new ets transcription factor that is activated by Ras. *Genes & development* 8, 1502-1513.
65. Goodman, C.S. (1996). Mechanisms and molecules that control growth cone guidance. *Annual review of neuroscience* 19, 341-377.
66. Green, E.K., Raybould, R., Macgregor, S., Hyde, S., Young, A.H., O'Donovan, M.C., Owen, M.J., Kirov, G., Jones, L., Jones, I., *et al.* (2006). Genetic variation of brain-

- derived neurotrophic factor (BDNF) in bipolar disorder: case-control study of over 3000 individuals from the UK. *Br J Psychiatry* 188, 21-25.
67. Greenberg, M.E., and Ziff, E.B. (1984). Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature* 311, 433-438.
68. Grunwald, I.C., Korte, M., Wolfner, D., Wilkinson, G.A., Unsicker, K., Lipp, H.P., Bonhoeffer, T., and Klein, R. (2001). Kinase-independent requirement of EphB2 receptors in hippocampal synaptic plasticity. *Neuron* 32, 1027-1040.
69. Gundersen, G.G., and Cook, T.A. (1999). Microtubules and signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 11, 81-94.
70. Hafner, C., Meyer, S., Hagen, I., Becker, B., Roesch, A., Landthaler, M., and Vogt, T. (2005). Ephrin-B reverse signaling induces expression of wound healing associated genes in IEC-6 intestinal epithelial cells. *World J Gastroenterol* 11, 4511-4518.
71. He, X.P., Minichiello, L., Klein, R., and McNamara, J.O. (2002). Immunohistochemical evidence of seizure-induced activation of trkB receptors in the mossy fiber pathway of adult mouse hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 7502-7508.
72. Hedgecock, E.M., Culotti, J.G., and Hall, D.H. (1990). The unc-5, unc-6, and unc-40 genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in *C. elegans*. *Neuron* 4, 61-85.
73. Henkemeyer, M., Orioli, D., Henderson, J.T., Saxton, T.M., Roder, J., Pawson, T., and Klein, R. (1996). Nuk controls pathfinding of commissural axons in the mammalian central nervous system. *Cell* 86, 35-46.
74. Hill, C.S., Wynne, J., and Treisman, R. (1995). The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* 81, 1159-1170.
75. Himanen, J.P., Chumley, M.J., Lackmann, M., Li, C., Barton, W.A., Jeffrey, P.D., Vearing, C., Geleick, D., Feldheim, D.A., Boyd, A.W., *et al.* (2004). Repelling class discrimination: ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling. *Nature neuroscience* 7, 501-509.
76. Holland, S.J., Gale, N.W., Mbamalu, G., Yancopoulos, G.D., Henkemeyer, M., and Pawson, T. (1996). Bidirectional signalling through the EPH-family receptor Nuk and its transmembrane ligands. *Nature* 383, 722-725.

77. Holtz, M.L., and Misra, R.P. (2008). Endothelial-specific ablation of serum response factor causes hemorrhaging, yolk sac vascular failure, and embryonic lethality. *BMC Dev Biol* 8, 65.
78. Hong, K., Hinck, L., Nishiyama, M., Poo, M.M., Tessier-Lavigne, M., and Stein, E. (1999). A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell* 97, 927-941.
79. Huang, E.J., and Reichardt, L.F. (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annual review of biochemistry* 72, 609-642.
80. Huber, A.B., Kolodkin, A.L., Ginty, D.D., and Cloutier, J.F. (2003). Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. *Annual review of neuroscience* 26, 509-563.
81. Johansen, F.E., and Prywes, R. (1994). Two pathways for serum regulation of the c-fos serum response element require specific sequence elements and a minimal domain of serum response factor. *Mol Cell Biol* 14, 5920-5928.
82. Johnson, K.G., McKinnell, I.W., Stoker, A.W., and Holt, C.E. (2001). Receptor protein tyrosine phosphatases regulate retinal ganglion cell axon outgrowth in the developing *Xenopus* visual system. *J Neurobiol* 49, 99-117.
83. Kalita, K., Kharebava, G., Zheng, J.J., and Hetman, M. (2006). Role of megakaryoblastic acute leukemia-1 in ERK1/2-dependent stimulation of serum response factor-driven transcription by BDNF or increased synaptic activity. *J Neurosci* 26, 10020-10032.
84. Kidd, T., Bland, K.S., and Goodman, C.S. (1999). Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. *Cell* 96, 785-794.
85. Klein, R., Nanduri, V., Jing, S.A., Lamballe, F., Tapley, P., Bryant, S., Cordon-Cardo, C., Jones, K.R., Reichardt, L.F., and Barbacid, M. (1991). The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* 66, 395-403.
86. Knoll, B., and Drescher, U. (2002). Ephrin-As as receptors in topographic projections. *Trends Neurosci* 25, 145-149.
87. Knoll, B., and Drescher, U. (2004). Src family kinases are involved in EphA receptor-mediated retinal axon guidance. *J Neurosci* 24, 6248-6257.

88. Knoll, B., Kretz, O., Fiedler, C., Alberti, S., Schutz, G., Frotscher, M., and Nordheim, A. (2006). Serum response factor controls neuronal circuit assembly in the hippocampus. *Nat Neurosci* 9, 195-204.
89. Knoll, B., and Nordheim, A. (2009). Functional versatility of transcription factors in the nervous system: the SRF paradigm. *Trends in neurosciences* 32, 432-442.
90. Knoll, B., Zarbali, K., Wurst, W., and Drescher, U. (2001). A role for the EphA family in the topographic targeting of vomeronasal axons. *Development* 128, 895-906.
91. Koegel, H., von Tobel, L., Schafer, M., Alberti, S., Kremmer, E., Mauch, C., Hohl, D., Wang, X.J., Beer, H.D., Bloch, W., *et al.* (2009). Loss of serum response factor in keratinocytes results in hyperproliferative skin disease in mice. *J Clin Invest* 119, 899-910.
92. Kolodkin, A.L., Matthes, D.J., and Goodman, C.S. (1993). The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* 75, 1389-1399.
93. Koshimizu, H., Kiyosue, K., Hara, T., Hazama, S., Suzuki, S., Uegaki, K., Nagappan, G., Zaitsev, E., Hirokawa, T., Tatsu, Y., *et al.* (2009). Multiple functions of precursor BDNF to CNS neurons: negative regulation of neurite growth, spine formation and cell survival. *Mol Brain* 2, 27.
94. Koyama, R., Yamada, M.K., Nishiyama, N., Matsuki, N., and Ikegaya, Y. (2004). Developmental switch in axon guidance modes of hippocampal mossy fibers in vitro. *Dev Biol* 267, 29-42.
95. Kraemer, R., and Hempstead, B.L. (2003). Neurotrophins: novel mediators of angiogenesis. *Front Biosci* 8, s1181-1186.
96. Krull, C.E., Lansford, R., Gale, N.W., Collazo, A., Marcelle, C., Yancopoulos, G.D., Fraser, S.E., and Bronner-Fraser, M. (1997). Interactions of Eph-related receptors and ligands confer rostrocaudal pattern to trunk neural crest migration. *Current biology : CB* 7, 571-580.
97. Kucharska, A., Rushworth, L.K., Staples, C., Morrice, N.A., and Keyse, S.M. (2009). Regulation of the inducible nuclear dual-specificity phosphatase DUSP5 by ERK MAPK. *Cell Signal* 21, 1794-1805.
98. Kuijper, S., Turner, C.J., and Adams, R.H. (2007). Regulation of angiogenesis by Eph-ephrin interactions. *Trends Cardiovasc Med* 17, 145-151.
99. Kullander, K., and Klein, R. (2002). Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 475-486.

100. Kullander, K., Mather, N.K., Diella, F., Dottori, M., Boyd, A.W., and Klein, R. (2001). Kinase-dependent and kinase-independent functions of EphA4 receptors in major axon tract formation in vivo. *Neuron* 29, 73-84.
101. Lahoute, C., Sotiropoulos, A., Favier, M., Guillet-Deniau, I., Charvet, C., Ferry, A., Butler-Browne, G., Metzger, D., Tuil, D., and Daegelen, D. (2008). Premature aging in skeletal muscle lacking serum response factor. *PLoS One* 3, e3910.
102. Latasa, M.U., Couton, D., Charvet, C., Lafanechere, A., Guidotti, J.E., Li, Z., Tuil, D., Daegelen, D., Mitchell, C., and Gilgenkrantz, H. (2007). Delayed liver regeneration in mice lacking liver serum response factor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292, G996-G1001.
103. Lewin, G.R., and Barde, Y.A. (1996). Physiology of the neurotrophins. *Annual review of neuroscience* 19, 289-317.
104. Li, G., and Pleasure, S.J. (2005). Morphogenesis of the dentate gyrus: what we are learning from mouse mutants. *Dev Neurosci* 27, 93-99.
105. Li, G., and Pleasure, S.J. (2010). Ongoing interplay between the neural network and neurogenesis in the adult hippocampus. *Current opinion in neurobiology* 20, 126-133.
106. Li, J.J., Liu, D.P., Liu, G.T., and Xie, D. (2009). EphrinA5 acts as a tumor suppressor in glioma by negative regulation of epidermal growth factor receptor. *Oncogene* 28, 1759-1768.
107. Li, Q.J., Yang, S.H., Maeda, Y., Sladek, F.M., Sharrocks, A.D., and Martins-Green, M. (2003). MAP kinase phosphorylation-dependent activation of Elk-1 leads to activation of the co-activator p300. *Embo J* 22, 281-291.
108. Li, S., Czubyrt, M.P., McAnally, J., Bassel-Duby, R., Richardson, J.A., Wiebel, F.F., Nordheim, A., and Olson, E.N. (2005). Requirement for serum response factor for skeletal muscle growth and maturation revealed by tissue-specific gene deletion in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 1082-1087.
109. Lim, Y.S., McLaughlin, T., Sung, T.C., Santiago, A., Lee, K.F., and O'Leary, D.D. (2008). p75(NTR) mediates ephrin-A reverse signaling required for axon repulsion and mapping. *Neuron* 59, 746-758.
110. Lin, A.C., and Holt, C.E. (2007). Local translation and directional steering in axons. *The EMBO journal* 26, 3729-3736.

111. Lowenstein, D.H., and Arsenault, L. (1996). The effects of growth factors on the survival and differentiation of cultured dentate gyrus neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16, 1759-1769.
112. Luo, L. (2000). Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat Rev Neurosci* 1, 173-180.
113. Luo, L., and O'Leary, D.D. (2005). Axon retraction and degeneration in development and disease. *Annual review of neuroscience* 28, 127-156.
114. Lykissas, M.G., Batistatou, A.K., Charalabopoulos, K.A., and Beris, A.E. (2007). The role of neurotrophins in axonal growth, guidance, and regeneration. *Curr Neurovasc Res* 4, 143-151.
115. Marler, K.J., Becker-Barroso, E., Martinez, A., Llovera, M., Wentzel, C., Poopalasundaram, S., Hindges, R., Soriano, E., Comella, J., and Drescher, U. (2008). A TrkB/EphrinA interaction controls retinal axon branching and synaptogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 12700-12712.
116. Martinez, A., Otal, R., Sieber, B.A., Ibanez, C., and Soriano, E. (2005). Disruption of ephrin-A/EphA binding alters synaptogenesis and neural connectivity in the hippocampus. *Neuroscience* 135, 451-461.
117. Mathern, G.W., Leite, J.P., Pretorius, J.K., Quinn, B., Peacock, W.J., and Babb, T.L. (1996). Severe seizures in young children are associated with hippocampal neuron losses and aberrant mossy fiber sprouting during fascia dentata postnatal development. *Epilepsy research Supplement* 12, 33-43.
118. McLaughlin, T., and O'Leary, D.D. (2005). Molecular gradients and development of retinotopic maps. *Annual review of neuroscience* 28, 327-355.
119. Mericskay, M., Blanc, J., Tritsch, E., Moriez, R., Aubert, P., Neunlist, M., Feil, R., and Li, Z. (2007). Inducible mouse model of chronic intestinal pseudo-obstruction by smooth muscle-specific inactivation of the SRF gene. *Gastroenterology* 133, 1960-1970.
120. Miano, J.M. (2010). Role of serum response factor in the pathogenesis of disease. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 90, 1274-1284.
121. Miano, J.M., Long, X., and Fujiwara, K. (2007). Serum response factor: master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C70-81.

122. Miano, J.M., Ramanan, N., Georger, M.A., de Mesy Bentley, K.L., Emerson, R.L., Balza, R.O., Jr., Xiao, Q., Weiler, H., Ginty, D.D., and Misra, R.P. (2004). Restricted inactivation of serum response factor to the cardiovascular system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 17132-17137.
123. Miao, H., Burnett, E., Kinch, M., Simon, E., and Wang, B. (2000). Activation of EphA2 kinase suppresses integrin function and causes focal-adhesion-kinase dephosphorylation. *Nat Cell Biol* *2*, 62-69.
124. Miao, H., Wei, B.R., Peehl, D.M., Li, Q., Alexandrou, T., Schelling, J.R., Rhim, J.S., Sedor, J.R., Burnett, E., and Wang, B. (2001). Activation of EphA receptor tyrosine kinase inhibits the Ras/MAPK pathway. *Nat Cell Biol* *3*, 527-530.
125. Mikl, M., Vendra, G., Doyle, M., and Kiebler, M.A. (2010). RNA localization in neurite morphogenesis and synaptic regulation: current evidence and novel approaches. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* *196*, 321-334.
126. Miller, K., Kolk, S.M., and Donoghue, M.J. (2006). EphA7-ephrin-A5 signaling in mouse somatosensory cortex: developmental restriction of molecular domains and postnatal maintenance of functional compartments. *J Comp Neurol* *496*, 627-642.
127. Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A.I., and Treisman, R. (2003). Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* *113*, 329-342.
128. Misra, R.P., Bonni, A., Miranti, C.K., Rivera, V.M., Sheng, M., and Greenberg, M.E. (1994). L-type voltage-sensitive calcium channel activation stimulates gene expression by a serum response factor-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry* *269*, 25483-25493.
129. Morris, T.A., Jafari, N., Rice, A.C., Vasconcelos, O., and DeLorenzo, R.J. (1999). Persistent increased DNA-binding and expression of serum response factor occur with epilepsy-associated long-term plasticity changes. *J Neurosci* *19*, 8234-8243.
130. Muehlich, S., Wang, R., Lee, S.M., Lewis, T.C., Dai, C., and Prywes, R. (2008). Serum-induced phosphorylation of the serum response factor coactivator MKL1 by the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway inhibits its nuclear localization. *Molecular and cellular biology* *28*, 6302-6313.

131. Murai, K.K., and Pasquale, E.B. (2003). 'Eph'ective signaling: forward, reverse and crosstalk. *J Cell Sci* 116, 2823-2832.
132. Nadler, J.V. (2003). The recurrent mossy fiber pathway of the epileptic brain. *Neurochem Res* 28, 1649-1658.
133. Nagashima, K., Endo, A., Ogita, H., Kawana, A., Yamagishi, A., Kitabatake, A., Matsuda, M., and Mochizuki, N. (2002). Adaptor protein Crk is required for ephrin-B1-induced membrane ruffling and focal complex assembly of human aortic endothelial cells. *Mol Biol Cell* 13, 4231-4242.
134. Nakamura, F., Kalb, R.G., and Strittmatter, S.M. (2000). Molecular basis of semaphorin-mediated axon guidance. *J Neurobiol* 44, 219-229.
135. Nguyen-Ba-Charvet, K.T., and Chedotal, A. (2002). Role of Slit proteins in the vertebrate brain. *J Physiol Paris* 96, 91-98.
136. Nievergall, E., Janes, P.W., Stegmayer, C., Vail, M.E., Haj, F.G., Teng, S.W., Neel, B.G., Bastiaens, P.I., and Lackmann, M. (2010). PTP1B regulates Eph receptor function and trafficking. *The Journal of cell biology* 191, 1189-1203.
137. Niu, Z., Yu, W., Zhang, S.X., Barron, M., Belaguli, N.S., Schneider, M.D., Parmacek, M., Nordheim, A., and Schwartz, R.J. (2005). Conditional mutagenesis of the murine serum response factor gene blocks cardiogenesis and the transcription of downstream gene targets. *The Journal of biological chemistry* 280, 32531-32538.
138. Norman, C., Runswick, M., Pollock, R., and Treisman, R. (1988). Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element. *Cell* 55, 989-1003.
139. Olson, E.N., and Nordheim, A. (2010). Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. *Nature reviews Molecular cell biology* 11, 353-365.
140. Otal, R., Burgaya, F., Frisen, J., Soriano, E., and Martinez, A. (2006). Ephrin-A5 modulates the topographic mapping and connectivity of commissural axons in murine hippocampus. *Neuroscience* 141, 109-121.
141. Parlakian, A., Tuil, D., Hamard, G., Tavernier, G., Hentzen, D., Concordet, J.P., Paulin, D., Li, Z., and Daegelen, D. (2004). Targeted inactivation of serum response factor in the developing heart results in myocardial defects and embryonic lethality. *Molecular and cellular biology* 24, 5281-5289.

142. Parri, M., Buricchi, F., Taddei, M.L., Giannoni, E., Raugei, G., Ramponi, G., and Chiarugi, P. (2005). EphrinA1 repulsive response is regulated by an EphA2 tyrosine phosphatase. *The Journal of biological chemistry* 280, 34008-34018.
143. Pasquale, E.B. (2005). Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 462-475.
144. Pasquale, E.B. (2008). Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell* 133, 38-52.
145. Piatti, V.C., Esposito, M.S., and Schinder, A.F. (2006). The timing of neuronal development in adult hippocampal neurogenesis. *Neuroscientist* 12, 463-468.
146. Pitulescu, M.E., and Adams, R.H. (2010). Eph/ephrin molecules--a hub for signaling and endocytosis. *Genes & development* 24, 2480-2492.
147. Platenik, J., Kuramoto, N., and Yoneda, Y. (2000). Molecular mechanisms associated with long-term consolidation of the NMDA signals. *Life Sci* 67, 335-364.
148. Posern, G., and Treisman, R. (2006). Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction. *Trends Cell Biol* 16, 588-596.
149. Ramanan, N., Shen, Y., Sarsfield, S., Lemberger, T., Schutz, G., Linden, D.J., and Ginty, D.D. (2005). SRF mediates activity-induced gene expression and synaptic plasticity but not neuronal viability. *Nat Neurosci* 8, 759-767.
150. Ramirez, S., Ait-Si-Ali, S., Robin, P., Trouche, D., and Harel-Bellan, A. (1997). The CREB-binding protein (CBP) cooperates with the serum response factor for transactivation of the c-fos serum response element. *J Biol Chem* 272, 31016-31021.
151. Raper, J.A. (2000). Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. *Current opinion in neurobiology* 10, 88-94.
152. Rashid, T., Upton, A.L., Blentic, A., Ciossek, T., Knoll, B., Thompson, I.D., and Drescher, U. (2005). Opposing gradients of ephrin-As and EphA7 in the superior colliculus are essential for topographic mapping in the mammalian visual system. *Neuron* 47, 57-69.
153. Reichardt, L.F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 361, 1545-1564.

154. Rosen, S.D., Hwang, S.T., GIBLIN, P.A., and Singer, M.S. (1997). High-endothelial-venule ligands for L-selectin: identification and functions. *Biochem Soc Trans* 25, 428-433.
155. Rossi, D., and Zlotnik, A. (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 18, 217-242.
156. Sahay, A., Molliver, M.E., Ginty, D.D., and Kolodkin, A.L. (2003). Semaphorin 3F is critical for development of limbic system circuitry and is required in neurons for selective CNS axon guidance events. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 6671-6680.
157. Sandstrom, J., Heiduschka, P., Beck, S.C., Philippar, U., Seeliger, M.W., Schraermeyer, U., and Nordheim, A. (2011). Degeneration of the mouse retina upon dysregulated activity of serum response factor. *Mol Vis* 17, 1110-1127.
158. Sasaki, Y., Welshhans, K., Wen, Z., Yao, J., Xu, M., Goshima, Y., Zheng, J.Q., and Bassell, G.J. (2010). Phosphorylation of zipcode binding protein 1 is required for brain-derived neurotrophic factor signaling of local beta-actin synthesis and growth cone turning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 9349-9358.
159. Schafer, D.P., and Stevens, B. (2010). Synapse elimination during development and disease: immune molecules take centre stage. *Biochem Soc Trans* 38, 476-481.
160. Schrott, G., Philippar, U., Berger, J., Schwarz, H., Heidenreich, O., and Nordheim, A. (2002). Serum response factor is crucial for actin cytoskeletal organization and focal adhesion assembly in embryonic stem cells. *J Cell Biol* 156, 737-750.
161. Schrott, G., Philippar, U., Hockemeyer, D., Schwarz, H., Alberti, S., and Nordheim, A. (2004). SRF regulates Bcl-2 expression and promotes cell survival during murine embryonic development. *Embo J* 23, 1834-1844.
162. Schrott, G., Weinhold, B., Lundberg, A.S., Schuck, S., Berger, J., Schwarz, H., Weinberg, R.A., Ruther, U., and Nordheim, A. (2001). Serum response factor is required for immediate-early gene activation yet is dispensable for proliferation of embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 21, 2933-2943.
163. Seki, T., and Rutishauser, U. (1998). Removal of polysialic acid-neural cell adhesion molecule induces aberrant mossy fiber innervation and ectopic synaptogenesis in the hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18, 3757-3766.

164. Serafini, T., Kennedy, T.E., Galko, M.J., Mirzayan, C., Jessell, T.M., and Tessier-Lavigne, M. (1994). The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 78, 409-424.
165. Settleman, J. (2003). A nuclear MAL-function links Rho to SRF. *Mol Cell* 11, 1121-1123.
166. Shamah, S.M., Lin, M.Z., Goldberg, J.L., Estrach, S., Sahin, M., Hu, L., Bazalakova, M., Neve, R.L., Corfas, G., Debant, A., *et al.* (2001). EphA receptors regulate growth cone dynamics through the novel guanine nucleotide exchange factor ephexin. *Cell* 105, 233-244.
167. Shore, P., and Sharrocks, A.D. (1994). The transcription factors Elk-1 and serum response factor interact by direct protein-protein contacts mediated by a short region of Elk-1. *Mol Cell Biol* 14, 3283-3291.
168. Shore, P., and Sharrocks, A.D. (1995). The MADS-box family of transcription factors. *Eur J Biochem* 229, 1-13.
169. Skutella, T., and Nitsch, R. (2001). New molecules for hippocampal development. *Trends in neurosciences* 24, 107-113.
170. Sperry, R.W. (1963). Chemoaffinity in the Orderly Growth of Nerve Fiber Patterns and Connections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 50, 703-710.
171. Stein, E., and Tessier-Lavigne, M. (2001). Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science* 291, 1928-1938.
172. Stern, S., Debre, E., Stritt, C., Berger, J., Posern, G., and Knoll, B. (2009). A nuclear actin function regulates neuronal motility by serum response factor-dependent gene transcription. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29, 4512-4518.
173. Stoppini, L., Buchs, P.A., and Muller, D. (1991). A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37, 173-182.
174. Stringer, J.L., Belaguli, N.S., Iyer, D., Schwartz, R.J., and Balasubramanyam, A. (2002). Developmental expression of serum response factor in the rat central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 138, 81-86.
175. Stritt, C., and Knoll, B. Serum response factor regulates hippocampal lamination and dendrite development and is connected with reelin signaling. *Mol Cell Biol* 30, 1828-1837.

176. Stritt, C., and Knoll, B. (2010). Serum response factor regulates hippocampal lamination and dendrite development and is connected with reelin signaling. *Molecular and cellular biology* 30, 1828-1837.
177. Stritt, C., Stern, S., Harting, K., Manke, T., Sinske, D., Schwarz, H., Vingron, M., Nordheim, A., and Knoll, B. (2009). Paracrine control of oligodendrocyte differentiation by SRF-directed neuronal gene expression. *Nature neuroscience* 12, 418-427.
178. Sun, K., Battle, M.A., Misra, R.P., and Duncan, S.A. (2009). Hepatocyte expression of serum response factor is essential for liver function, hepatocyte proliferation and survival, and postnatal body growth in mice. *Hepatology* 49, 1645-1654.
179. Sun, Q., Chen, G., Streb, J.W., Long, X., Yang, Y., Stoeckert, C.J., Jr., and Miano, J.M. (2006). Defining the mammalian CArGome. *Genome research* 16, 197-207.
180. Suto, F., Tsuboi, M., Kamiya, H., Mizuno, H., Kiyama, Y., Komai, S., Shimizu, M., Sanbo, M., Yagi, T., Hiromi, Y., *et al.* (2007). Interactions between plexin-A2, plexin-A4, and semaphorin 6A control lamina-restricted projection of hippocampal mossy fibers. *Neuron* 53, 535-547.
181. Tamura, M., Koyama, R., Ikegaya, Y., Matsuki, N., and Yamada, M.K. (2006). K252a, an inhibitor of Trk, disturbs pathfinding of hippocampal mossy fibers. *Neuroreport* 17, 481-486.
182. Tarnawski, A.S. (2005). Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. *Dig Dis Sci* 50 Suppl 1, S24-33.
183. Tawarayama, H., Yoshida, Y., Suto, F., Mitchell, K.J., and Fujisawa, H. (2010). Roles of semaphorin-6B and plexin-A2 in lamina-restricted projection of hippocampal mossy fibers. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 7049-7060.
184. Tedder, T.F., Steeber, D.A., Chen, A., and Engel, P. (1995). The selectins: vascular adhesion molecules. *Faseb J* 9, 866-873.
185. Tessier-Lavigne, M., and Goodman, C.S. (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science* 274, 1123-1133.
186. Theodosiou, A., and Ashworth, A. (2002). MAP kinase phosphatases. *Genome Biol* 3, REVIEWS3009.
187. Togashi, H., Sakisaka, T., and Takai, Y. (2009). Cell adhesion molecules in the central nervous system. *Cell Adh Migr* 3, 29-35.

188. Tong, J., Elowe, S., Nash, P., and Pawson, T. (2003). Manipulation of EphB2 regulatory motifs and SH2 binding sites switches MAPK signaling and biological activity. *The Journal of biological chemistry* 278, 6111-6119.
189. Tong, L., Balazs, R., Thornton, P.L., and Cotman, C.W. (2004). Beta-amyloid peptide at sublethal concentrations downregulates brain-derived neurotrophic factor functions in cultured cortical neurons. *J Neurosci* 24, 6799-6809.
190. Torii, S., Nakayama, K., Yamamoto, T., and Nishida, E. (2004). Regulatory mechanisms and function of ERK MAP kinases. *J Biochem* 136, 557-561.
191. Treisman, R. (1986). Identification of a protein-binding site that mediates transcriptional response of the c-fos gene to serum factors. *Cell* 46, 567-574.
192. Verdoni, A.M., Ikeda, S., and Ikeda, A. (2010). Serum response factor is essential for the proper development of skin epithelium. *Mamm Genome* 21, 64-76.
193. Wang, D., Chang, P.S., Wang, Z., Sutherland, L., Richardson, J.A., Small, E., Krieg, P.A., and Olson, E.N. (2001). Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell* 105, 851-862.
194. Wang, D.Z., Li, S., Hockemeyer, D., Sutherland, L., Wang, Z., Schratt, G., Richardson, J.A., Nordheim, A., and Olson, E.N. (2002). Potentiation of serum response factor activity by a family of myocardin-related transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14855-14860.
195. Wang, K.H., Brose, K., Arnott, D., Kidd, T., Goodman, C.S., Henzel, W., and Tessier-Lavigne, M. (1999). Biochemical purification of a mammalian slit protein as a positive regulator of sensory axon elongation and branching. *Cell* 96, 771-784.
196. Wang, Z., Wang, D.Z., Pipes, G.C., and Olson, E.N. (2003). Myocardin is a master regulator of smooth muscle gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7129-7134.
197. Wickramasinghe, S.R., Alvania, R.S., Ramanan, N., Wood, J.N., Mandai, K., and Ginty, D.D. (2008). Serum response factor mediates NGF-dependent target innervation by embryonic DRG sensory neurons. *Neuron* 58, 532-545.
198. Wiebel, F.F., Rennekampff, V., Vintersten, K., and Nordheim, A. (2002). Generation of mice carrying conditional knockout alleles for the transcription factor SRF. *Genesis* 32, 124-126.
199. Wiegert, J.S., Bengtson, C.P., and Bading, H. (2007). Diffusion and not active transport underlies and limits ERK1/2 synapse-to-nucleus signaling in hippocampal neurons. *The Journal of biological chemistry* 282, 29621-29633.

200. Winslow, J.W., Moran, P., Valverde, J., Shih, A., Yuan, J.Q., Wong, S.C., Tsai, S.P., Goddard, A., Henzel, W.J., Hefti, F., *et al.* (1995). Cloning of AL-1, a ligand for an Eph-related tyrosine kinase receptor involved in axon bundle formation. *Neuron* 14, 973-981.
201. Xia, Z., Dudek, H., Miranti, C.K., and Greenberg, M.E. (1996). Calcium influx via the NMDA receptor induces immediate early gene transcription by a MAP kinase/ERK-dependent mechanism. *J Neurosci* 16, 5425-5436.
202. Xu, N.J., and Henkemeyer, M. (2009). Ephrin-B3 reverse signaling through Grb4 and cytoskeletal regulators mediates axon pruning. *Nature neuroscience* 12, 268-276.
203. Xu, Z.Q., Sun, Y., Li, H.Y., Lim, Y., Zhong, J.H., and Zhou, X.F. (2011). Endogenous proBDNF is a negative regulator of migration of cerebellar granule cells in neonatal mice. *Eur J Neurosci* 33, 1376-1384.
204. Yan, Q., Rosenfeld, R.D., Matheson, C.R., Hawkins, N., Lopez, O.T., Bennett, L., and Welcher, A.A. (1997). Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system. *Neuroscience* 78, 431-448.
205. Yang, S.H., and Sharrocks, A.D. (2004). SUMO promotes HDAC-mediated transcriptional repression. *Molecular cell* 13, 611-617.
206. Yates, P.A., Roskies, A.L., McLaughlin, T., and O'Leary, D.D. (2001). Topographic-specific axon branching controlled by ephrin-As is the critical event in retinotectal map development. *J Neurosci* 21, 8548-8563.
207. Yoo, S., Kim, Y., Noh, H., Lee, H., Park, E., and Park, S. (2011). Endocytosis of EphA receptors is essential for the proper development of the retinocollicular topographic map. *The EMBO journal* 30, 1593-1607.
208. Yoon, B.C., Zivraj, K.H., and Holt, C.E. (2009). Local translation and mRNA trafficking in axon pathfinding. *Results Probl Cell Differ* 48, 269-288.
209. Yuan, X.B., Jin, M., Xu, X., Song, Y.Q., Wu, C.P., Poo, M.M., and Duan, S. (2003). Signalling and crosstalk of Rho GTPases in mediating axon guidance. *Nature cell biology* 5, 38-45.
210. Yue, X., Dreyfus, C., Kong, T.A., and Zhou, R. (2008). A subset of signal transduction pathways is required for hippocampal growth cone collapse induced by ephrin-A5. *Dev Neurobiol* 68, 1269-1286.
211. Yue, Y., Chen, Z.Y., Gale, N.W., Blair-Flynn, J., Hu, T.J., Yue, X., Cooper, M., Crockett, D.P., Yancopoulos, G.D., Tessarollo, L., *et al.* (2002). Mistargeting hippocampal

- axons by expression of a truncated Eph receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 10777-10782.
212. Zhao, C., Deng, W., and Gage, F.H. (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132, 645-660.
213. Zhuang, G., Hunter, S., Hwang, Y., and Chen, J. (2007). Regulation of EphA2 receptor endocytosis by SHIP2 lipid phosphatase via phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent Rac1 activation. *The Journal of biological chemistry* 282, 2683-2694.
214. Zimmer, M., Palmer, A., Kohler, J., and Klein, R. (2003). EphB-ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion. *Nature cell biology* 5, 869-878.
215. Zou, J.X., Wang, B., Kalo, M.S., Zisch, A.H., Pasquale, E.B., and Ruoslahti, E. (1999). An Eph receptor regulates integrin activity through R-Ras. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 13813-13818.

9 Veröffentlichungen

Posterpräsentationen

8. Treffen der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft, 25.-29.03.2009, Göttingen

Titel: "BDNF/ephrin-modulated neuronal motility relies on SRF-dependent gene expression." Meier C., Knöll B. 2009

Annual Meeting of The Society of Neuroscience, 13.-17.11.2010, San Diego, USA

Titel: "EphrinA5 modulates neurotrophin-stimulated gene expression and growth cone motility in an SRF-dependent manner." Meier C., Knöll B. 2010

Publikationen

Titel: "Ephrin-A5 suppresses neurotrophin evoked neuronal motility, ERK activation and gene expression." Meier C., Anastasiadou S., Knöll B. 2011 (PLoS ONE, in Revision)

10 Danksagung

Die Seiten 191-192 enthalten persönliche Daten. Sie sind deshalb nicht Bestandteil der Veröffentlichung.

11 Curriculum Vitae