

Die funktionelle Bedeutung der Serin/Threonin-Kinase Ndr2 in Integrin-Signalwegen für die Differenzierung neuronaler Zellen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Dipl.-Biol. Kati Rehberg
geb. am 18.08.1981 in Magdeburg

Gutachter: Prof. Dr. sc. Oliver Stork

Prof. Dr. med. Gabriele M. Rune

eingereicht am: 20. Mai 2011
verteidigt am: 1. November 2011

„Gedächtnis verbindet die zahllosen Einzelphänomene zu einem Ganzen, und wie unser Leib in unzählige Atome zerrieben müsste, wenn nicht die Attraktion der Materie ihn zusammenhielte, so zerfiele ohne die bindende Macht des Gedächtnisses unser Bewusstsein in so viele Splitter, als es Augenblicke zählt.“

Ewald Hering, 1870

Zusammenfassung

Im sich entwickelnden Nervensystem werden die Prozesse zur Differenzierung von Neuronen, wie zum Beispiel das Auswachsen und die Verzweigung der Neuriten, über die Aktivität von Proteinkinasen und -phosphatasen reguliert. Für die Mitglieder der Ndr-Serin/Threonin-Kinasefamilie Trc, Warts und SAX-1 aus der Fruchtfliege *D. melanogaster* bzw. dem Nematoden *C. elegans* ist bereits seit längerem bekannt, dass sie Aktin-abhängige morphologische Wachstumsprozesse regulieren, insbesondere die Verzweigung und das *tiling* der Dendriten sensorischer Neurone. In der hier vorliegenden Arbeit untersuchte ich die potentielle Funktion der säugetierspezifischen Ndr-Kinase Ndr2 in der Differenzierung von Neuronen des ZNS. Anhand hippokampaler Primärneurone konnte ich beobachten, dass eine Überexpression der Kinase die Verzweigung der Dendriten stark erhöhte, hingegen eine shRNA-vermittelte Inhibierung der Expression von Ndr2 zu einer massiven Reduktion der dendritischen Verzweigung führte. Dabei zeigte sich, dass Ndr2 das Auswachsen der Dendriten abhängig von einer Integrin-vermittelten Zelladhäsion regulierte. Weiterhin konnte ich nachweisen, dass Ndr2 den Gehalt aktivierten β 1-Integrins in den Wachstumskegeln differenzierter PC12-Zellen reguliert. Biochemische sowie zellbiologische Analysen zeigten darüber hinaus, dass Ndr2 an die GTPase Dynamin bindet und sowohl in hippokampalen Primärneuronen als auch in PC12-Zellen mit dem Endozytose/Exozytose-Signalweg der Integrine interagiert. Aufgrund dieser gewonnenen Daten vermute ich, dass Ndr2 die Aktivität der Integrine zum einen über ein Recycling der Zelladhäsionsmoleküle in der Plasmamembran und zum anderen über eine funktionelle Beteiligung in einem *inside-out*-Signalweg reguliert und dadurch das Auswachsen und die Verzweigung der Dendriten von Neuronen im sich entwickelnden Nervensystem kontrolliert. Weiterhin konnte ich anhand der biochemischen und morphologischen Charakterisierung eines konditionalen Ndr2-transgenen Mausmodells beobachten, dass sich in Folge einer Überexpression von Ndr2 im Hippokampus die Dichte der suprapyramidalen Moosfaserterminalien der Körnerzellen stark verringerte. Diese morphologische Veränderung legt somit die Vermutung nahe, dass Ndr2 neben der Regulation der Verzweigung von Dendriten auch das Auswachsen von Axonen während der Entwicklung des ZNS kontrollieren könnte.

Neben der Regulation von Wachstumsprozessen im sich entwickelnden ZNS unterliegen im adulten Gehirn die Prozesse der Gedächtnisbildung ebenfalls einer Neu- bzw. Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts. Interessanterweise wird sowohl β -Aktin als auch die Aktin-bindende Kinase Ndr2 sechs Stunden nach einer Furchtkonditionierung vermehrt in der BLA exprimiert. Daher untersuchte ich in einem weiteren Teil meiner Arbeit, ob diese Expressionsregulation mit einer von der Dynamik der Aktinfilamente abhängigen kritischen Phase in der BLA korreliert. In der Tat konnte ich zeigen, dass eine Blockade der Aktindynamik in der BLA durch eine Behandlung mit Phalloidin nur in dem Zeitraum zwischen 6 und 12 Stunden nach der Akquisition bzw. der Reaktivierung zu einer Beein-

trächtigung eines tonassoziierten Furchtgedächtnisses führte. Dies weist darauf hin, dass sowohl die Konsolidierung als auch die Rekonsolidierung von Gedächtnisinhalten einer zeitlich koordinierten strukturellen Reorganisation der Aktinfilamente in der BLA unterliegt. Weiterhin zeigten die gewonnenen Daten, dass die Regulation der Expression von Ndr2 zeitlich mit der strukturellen Dynamik der Aktinfilamente in der BLA korreliert. Dies könnte somit ein Hinweis darauf sein, dass Ndr2 in der Bildung eines emotionalen Gedächtnisses involviert ist.

Summary

In the developing nervous system neuronal differentiation processes such as the outgrowth and branching of neurites are regulated by various protein kinases and phosphatases. Previously, members of the Ndr serine/threonine kinase family in *D. melanogaster* (Warts and Tricornered) and *C. elegans* (SAX-1) have been shown to regulate actin-dependent growth and morphogenesis, including dendritic branching and *tiling*. In this study I investigated the potential role of the mammalian Ndr-kinase Ndr2 in dendritic outgrowth of neurons of the central nervous system. I could show that in hippocampal primary neurons overexpression of Ndr2 induces an increase, whereas an inhibition of Ndr2 expression with small hairpin RNA resulted in a decrease in dendritic branching. The Ndr2-dependent outgrowth proved to depend on integrin-mediated cell adhesion. Moreover, I could demonstrate that Ndr2 regulates the amount of activated β 1-integrin in growth cones of differentiated PC12 cells and further, that Ndr2 binds to the GTPase Dynamin and associates with the recycling pathway of integrins in both primary hippocampal neurons and PC12 cells. Thus I suggest that Ndr2 controls the outgrowth and branching of neurons in the developing nervous system through an involvement in inside-out signalling and recycling pathways of integrins. In addition to these cellular studies, a biochemical and morphological characterisation of a novel conditional Ndr2-transgenic mouse model exhibited a prominent transgene expression in the hippocampus. Most notably, in these mice a decreased density of the suprapyramidal mossy fibre terminals became evident. This indicates that Ndr2 is also involved in the regulation of axonal outgrowth *in vivo*.

In addition to its role in neuronal development, structural rearrangement of the actin cytoskeleton is critically important for neural plasticity in the adult brain. In fact, the expression of β -actin and Ndr2 has been shown to transiently increase in the BLA 6 hours after fear conditioning. Therefore in a further part of this study I addressed the question whether this regulation may coincide with a critical phase of actin filament dynamics in the BLA. Indeed I could show, that a phalloidin-mediated actin filament arrest in the BLA leads to a disruption of auditory cued fear memory when induced between 6 to 12 hours after its acquisition and reactivation, respectively. Thus, both the consolidation and the reconsolidation of fear memory appear to involve a temporally coordinated dynamic of actin filaments in the BLA. Changes of Ndr2 expression fall into a sensitive phase of actin dynamics in the BLA and hence Ndr2 may be involved in processes of emotional memory formation.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	III
Abbildungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Die Serin/Threonin-Kinase Ndr2	2
1.1.1 Ndr2 ist ein Mitglied der Ndr-Serin/Threonin-Kinasefamilie	2
1.1.2 Ndr2 besitzt neben einer Bindungsstelle für Mob eine weitere für das kalziumbindende Protein S100	3
1.1.3 Ndr2 wird an der Plasmamembran aktiviert	5
1.1.4 Expression und zelluläre Lokalisation von Ndr2	6
1.1.5 Ndr-Kinasen üben wichtige Funktionen zur Regulation des Zellzy- klusses, der Zellproliferation und der Apoptose aus	7
1.1.6 Ndr2 und seine Homologe regulieren neuronale Differenzierungsvor- gänge	8
1.2 Das Zytoskelettprotein Aktin	11
1.2.1 Das Aktinzytoskelett in Neuronen des ZNS	11
1.2.2 Im zentralen Nervensystem beruhen Lern- und Gedächtnisprozesse auf der Dynamik des Aktinzytoskeletts	12
1.3 Das Zelladhäsionsmolekül Integrin	14
1.3.1 Die Funktion der Integrine in neuronalen Zellen	14
1.3.2 Die Aktivität der Integrine wird über bidirektionale sowie über En- dozytose/Exozytose-Signalwege reguliert	15
1.4 Zielstellungen	18
2 Materialien	19
2.1 Reagenzien, Lösungen und Medien	19
2.2 Kits	22
2.3 DNA-Standards	22
2.4 Protein-Standards	22

2.5	Bakterienstamm	23
2.6	Zelllinien	23
2.7	Mausstämme	23
2.8	Primärantikörper	24
2.9	Sekundärantikörper	24
2.10	Materialien	25
2.11	Software	26
3	Methoden	27
3.1	Zellbiologische Methoden	27
3.1.1	Primäre hippokampale Neuronenkultur kokultiviert mit einem Astrogliazellen	27
3.1.2	Zelllinien	33
3.1.3	Pharmakologische Untersuchungen zur Differenzierung von PC12-Zellen	35
3.2	Verhaltensbiologische Methoden	37
3.2.1	Mausstämme	37
3.2.2	Bilaterale Implantation von Führungskanülen in die basolaterale Amygdala	38
3.2.3	Auditorische Furchtkonditionierung und intraamygdaläre Injektion	39
3.2.4	Erhöhter-Plus-Labyrinth-Test	42
3.2.5	Statistische Analyse	43
3.3	Molekularbiologische Methoden	43
3.3.1	Transformation und Aufreinigung von Plasmid-DNA	43
3.3.2	Bestimmung der DNA-Konzentration mittels Photometrie	46
3.3.3	Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanzspitzen	47
3.3.4	Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	47
3.3.5	Agarosegel-Elektrophorese	49
3.4	Biochemische Methoden	50
3.4.1	Immunpräzipitation (IP)	50
3.4.2	Subzelluläre Fraktionierung mittels Gradientenzentrifugation	52
3.4.3	Präzipitation und Aufreinigung von Aktinfilamenten aus murinern Hirngewebe	53
3.4.4	Proteinkonzentrationsbestimmung	54
3.4.5	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	55
3.4.6	Western-Blot	56
3.4.7	Färbung membrangebundener Proteine	57
3.4.8	Immunologische Detektion membrangebundener Proteine	57
3.5	Immunzytochemie	58
3.5.1	Fixierung von Zellen	58

3.5.2	Immunfluoreszenzfärbung	59
3.5.3	Mikroskopische Auswertung immunfluoreszenzgefärbter Zellen	59
3.5.4	Intensitätsanalyse des Fluoreszenzsignals immunzytochemisch markierter Proteine	60
3.5.5	Statistische Analyse	60
3.6	Immunhistochemie und Histologie	61
3.6.1	Perfusion adulter Mäusen	61
3.6.2	Herstellung PLL-beschichteter Objektträger	61
3.6.3	Herstellung von Kryostatschnitten	62
3.6.4	DAB-Färbung von Gewebeschnitten mittels der ABC-Methode	62
3.6.5	Fluoreszenzfärbung von Aktinfilamenten in Gewebeschnitten	63
3.6.6	Nissl-Färbung	64
3.6.7	Black-Gold-Färbung	64
3.6.8	Timm-Silbersulfid-Färbung	65
4	Ergebnisse	68
4.1	Die Bedeutung der Serin/Threonin-Kinase Ndr2 für die neuronale Differenzierung von PC12-Zellen und hippocampalen Primärneuronen	68
4.1.1	Ndr2 reguliert abhängig von dem Zelladhäsionsmolekül Integrin das Auswachsen der Neuriten von PC12-Zellen	68
4.1.2	Ndr2 reguliert abhängig von einer Integrin-vermittelten Zelladhäsion die dendritische Verzweigung hippocampaler Primärneuronen	71
4.1.3	Ndr2 reguliert den Gehalt aktivierten β 1-Integrins in auswachsenden neuronalen Strukturen und ist am Integrin-Endozytose/Exozytose-Signalweg beteiligt	78
4.1.4	Charakterisierung der konditionalen Ndr2-transgenen Mauslinien Ndr2 ^{lox/tg55} und Ndr2 ^{lox/tg89}	87
4.1.5	Untersuchung der Abhängigkeit der Konsolidierung bzw. Rekonsolidierung eines tonabhängigen Furchtgedächtnisses von der Aktinfilamentdynamik	97
4.1.6	Biochemische und histochemische Untersuchung der Integration von Phalloidin in die Zelle und dessen intrazelluläre Wirkung auf die Stabilität der Aktinfilamente	103
5	Diskussion	106
5.1	Die Serin/Threonin-Kinase Ndr2 reguliert während der Entwicklung das Auswachsen und die Verzweigung von Dendriten und Axonen	106
5.1.1	Ndr2 kontrolliert über eine Regulation der Aktivität von Integrinen das Wachstum und die Verzweigung der Dendriten in Neuronen	107
5.1.2	Ndr2 reguliert über Endozytose/Exozytose-Signalwege die Aktivität von Integrinen	109

5.1.3	Ndr2 reguliert das Auswachsen und die Verzweigung der suprapyramidalen Moosfaserprojektionen im Hippokampus	111
5.1.4	Die Konsolidierung und Rekonsolidierung eines Furchtgedächtnisses ist abhängig von der Dynamik des Aktinzytoskeletts in der BLA . .	113
5.1.5	Eine Blockade der Aktindynamik in der BLA sechs Stunden nach der Akquisition beeinträchtigt die Konsolidierung eines tonabhängigen Furchtgedächtnisses	114
5.1.6	Die Rekonsolidierung eines tonabhängigen Furchtgedächtnisses unterliegt ebenfalls einer strukturellen Reorganisation der Aktinfilamente in der BLA	115
5.1.7	Phalloidin erhöht den Gehalt komplexer Aktinfilamente zwei Stunden nach der Injektion	116
5.1.8	Schlussfolgerungen und zukünftige Perspektiven	118
Anhang		121
Literaturverzeichnis		123
Lebenslauf		141
Publikationsliste		143

Abbildungsverzeichnis

1.1	Struktur von Ndr2	4
1.2	Modell des Aktivierungssignalweges von Ndr2	5
1.3	Erhöhung des Neuritenlängenwachstums von Ndr2-transfizierten PC12-Zellen EGFP-Ndr2 ist abhängig von der extrazellulären Kalziumkonzentration . .	10
1.4	In EGFP-Ndr2-transfizierten PC12-Zellen wurde die Kollagen IV-vermittelte Induktion des Neuritenlängenwachstums blockiert.	11
1.5	Modell des Integrin-Endozytose/Exozytose-Signalweges	17
3.1	Interferenzkontrastaufnahme einer hippocampalen Primärkultur (DIV7) . .	30
3.2	Sholl-Analyse eines EGFP-transfizierten Neurons	33
3.3	Morphologische Differenzierung von PC12-Zellen auf unterschiedlichen Sub- straten	37
3.4	Schematische Darstellung der Position der bilateral implantierten Kanülen in der BLA	39
3.5	Schematische Darstellung des auditorischen Furchtkonditionierungsparadig- mas	40
3.6	Experimenteller Zeitverlauf	41
3.7	Model des Protein G-Sepharose gekoppelten Antigen-Antikörper-Komplexes	50
3.8	Model eines kontinuierlichen Saccharosegradienten	53
4.1	Morphologische Analyse stabil-transfizierter PC12-Zellen	70
4.2	Immunfluoreszenzfärbung hippocampaler Primärneurone (DIV14)	72
4.3	Immunfluoreszenzfärbung transfizierter hippocampaler Primärneurone (DIV7)	73
4.4	Mikroskopische Aufnahme des Fluoreszenzsignals transfizierter hippokam- paler Primärneurone (DIV7)	75
4.5	Quantitative Analyse des dendritischen Wachstums	76
4.6	Vergleich proximaler und distaler Dendriten	77
4.7	Immunfluoreszenzfärbung EGFP-Ndr2-transfizierter PC12-Zellen	78
4.8	Intensitätsanalyse immunfluoreszenzmarkierten β 1-Integrins in Wachstums- kegeln	79
4.9	Lokalisation transgener Ndr2 an frühen Endosomen in hippocampalen Pri- märneuronen (DIV7)	81

4.10	Lokalisation von Ndr2 an Integrin-positiven frühen Endosomen hippokampaler Primärneurone (DIV14)	82
4.11	Lokalisation von Ndr2 an Integrin-positiven Recycling-Endosomen hippokampaler Primärneurone (DIV14)	83
4.12	Nachweise von Ndr2 in endosomalen Fraktionen von PC12-Zellen	84
4.13	Koimmunpräzipitation von Dynamin (1/2) mit Ndr2	85
4.14	Kolokalsiation von Ndr2 mit β 1-Integrin und Dynamin in hippokampalen Primärneuronen (DIV14)	86
4.15	Modell der Ndr2-Expressionskassette	87
4.16	Nachweis Ndr2-transgener Mäuse	88
4.17	PCR-Analyse der im Genom vorliegenden Ndr2-Expressionskassette	89
4.18	Expressionsnachweis transgener Ndr2	91
4.19	Expression transgener Ndr2 im Gehirn	92
4.20	Detaillierte Expressionsanalyse transgener Ndr2	93
4.21	Axonale Fasern Ndr2-transgener Mäuse	94
4.22	Reduktion der suprapyramidalen Moosfaserprojektionen in Ndr2-transgenen Mäusen	95
4.23	Hippokampale Moosfaserprojektionen in juvenilen und adulten Ndr2-transgenen Tieren	96
4.24	Graphische Darstellung der Kanülenpositionen	98
4.25	Phalloidin-Injektionen vermindern die Konsolidierung und Rekonsolidierung der Furchtantwort auf den CS ⁺	99
4.26	Furchtantwort auf die einzelnen Präsentationen des CS ⁺	100
4.27	Phalloidin-Injektionen vermindern die Furchtantwort auf den CS ⁻	101
4.28	Spezifische Wirkung von Phalloidin-Injektionen auf die Rekonsolidierung des Hintergrundkontextgedächtnisses	102
4.29	Phalloidin-behandelte Tiere weisen ein unverändertes Angstverhalten in einem Erhöhten-Plus-Labyrinth auf	103
4.30	Zeitliche Analyse der Wirkung von Phalloidin	104
5.1	Modell der Interaktion von Ndr2 mit dem Endozytose/Exozytose-Signalweg der Integrine	111
5.2	Modell des zeitlichen Verlaufs der Wirkung von Phalloidin in der BLA auf die Konsolidierung bzw. Rekonsolidierung des tonabhängigen, kontextuellen bzw. generalisierten Furchtgedächtnisses	117
5.3	Erhöhtes Explorationsverhalten von CamKII-CRE/Ndr2 ^{lox/tg} -Mäuse in einem Offenfeldtest	121
5.4	CamKII-CRE/Ndr2 ^{lox/tg} -Mäuse zeigen keine Veränderung in der Konsolidierung bzw. Rekonsolidierung eines tonassozierten Furchtgedächtnisses	122

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abs.	Abschnitt
AIS	autoinhibitorische Sequenz
AMPA	engl. α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ANOVA	engl. analysis of variance
APS	Ammoniumpersulfat
AraC	engl. β -D-Arabinofuranosyl-cytosine
Arf6	engl. ADP-ribosylation factor 6
Arp	2/3 engl. actin related protein 2/3
B	Belgien
BLA	basolaterale Amygdala
β -ME	b-Mercaptoethanol
bp	Basenpaare
BSA	engl. bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
$^{\circ}$ C	Grad Celsius
ca.	lat. circa
CA	Cornus ammonis
Ca	Commissura anterior
Cc	Corpus callosum
cDNA	copy-DNA
CeA	zentrale Amygdala
cfu	engl. colonies forming units
CGL	Corpus geniculatum laterale
CH	Schweiz
CMV	engl. human cytomegalovirus
CNF1	engl. cytotoxic necrotizing factor 1
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CP	Caudatum Putamen
CRE	engl. cAMP response element
CREB	engl. cre binding protein
CS	engl. conditioned stimulus

d	lat. dies
D	Deutschland
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dB	Dezibel
ddH ₂ O	engl. double distilled H ₂ O
ddH ₂ O	engl. distilled H ₂ O
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DNA	engl. deoxyribonucleic acid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DIV	engl. days in vitro
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	lat. Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEA1	engl. early endosome antigen 1
EGFP	engl. enhanced Green Fluorescent Protein
EGTA	Ethylendioxy-bis-(ethylenitrilo)-tetraessigsäure
engl.	englisch
et al.	lat. et alii
etc.	lat. et cetera
FAK	engl. focal adhesion kinase
FBS	engl. fetal bovine serum
FIN	Finnland
Fry	Furry
g	Erdbeschleunigung bzw. Gramm
GB	Großbritannien
GD	Gyrus dentatus
GZ	Körnerzellschicht
h	lat. hora
HBSS	engl. Hank's balanced salt solution
HCL	Chlorwasserstoffsäure
HEK	engl. human embryonal kidney
HeLa	Henrietta Lacks
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	engl. horseradish peroxidase
HS	engl. horse serum
ICAM	engl. intercellular cell adhesion molecule
Ig	Immunglobulin
IIP	infra-intrapiramidal
i.m.	intramuskulär
IP	Immunopräzipitation
i.p.	interperitoneal

JPN	Japan
kDa	Kilodalton
l	Liter
LA	laterale Amygdala
Lats	engl. large tumor suppressor
LAS AF	Leica Application Suite Advanced Fluorescence
LB	Luria Bertani
LIMK1	engl. LIM-Kinase 1
M	mol/l
μ	mikro
mA	Milliampere
MEN	engl. mitotic exit network
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MF	Moosfasern
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol pro Liter
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
Mob	engl. Mps one binder
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
Mst	engl. Mammalian Ste20-like kinases
MW	Mittelwert
ng	Nanogramm
NGF	engl. nerve growth factor
Ndr	engl. nuclear Dbf2-related
NIST	Nucleus interstitialis striae terminalis
NL	Niederlande
NLS	engl. nuclear localisation signal
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
n. s.	nicht signifikant
OD	Optische Dichte
P	postnatal
Pc	Pedunculus cerebri
PAGE	engl. polyacrylamid gelelectrophorese
Pak1	engl. p21 activated kinase 1
PBS	engl. phosphate buffered saline
PB	engl. phosphate buffer
PC12	engl. pheochromacytome cells 12
PCR	engl. Polymerase chain reaction
PLL	Poly-L-Lysin

PDL	Poly- D- Lysin
PFA	Paraformaldehyd
pH	lat. potentia Hydrogenii
PKC	engl. protein kinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Poly (A)	Polyadenylierungssignal
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PSG	Penicillin/ Streptomycin/ L-Glutamin
pSSC-	primärer somatosensorischer Kortex
RANOVA	engl. repeated measures analysis of variance
RNA	engl. ribonucleic acid
ROI	engl. region of interest
PLSD	engl. protected leased significant difference
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
s	Sekunde(n)
Sav	Salvador
SAX	engl. sensory axon guidance
SDS	engl. sodiumdodecylsulfate
Ser	Serin
SFM	Standardfehler des Mittelwertes
SN	Substantia nigra
SP	Septum pellucidum
Ste20	engl. serine/threonine sterile 20
Stk38	engl. serine/threonine kinase 38
Stk38l	engl. serine/threonine kinase 38 like
SV40	engl. simian virus 40
Tab.	Tabelle
TBS	engl. tris buffered saline
Thr	Threonin
Trc	engl. Tricornered
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TE	Tris- Ethylendiamintetraacetat
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethylendiamin
TOR	engl. target of rapamycin
TORC	engl. TOR complex
Tyr	Tyrosin
U	Unit
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
US	unkonditionierter Stimulus
USA	engl. united states of america
V	Volt
VCAM	engl. vascular cell adhesion molecule

VPM	Nucleus ventralis posteromedialis
WB	engl. western blotting
WPI	World Precision Instruments
z. B.	zum Beispiel

Kapitel 1

Einleitung

Während der Entwicklung des zentralen Nervensystems werden viele der morphologischen Differenzierungsvorgänge von Neuronen, unter anderem das initiale Auswachsen von Neuriten sowie die nachfolgende Elongation der Axone und die Verzweigung der Dendriten, über extrazelluläre Faktoren wie zum Beispiel Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM) und neurotrophe Faktoren reguliert (Kiryushko et al., 2004). Diese Prozesse unterliegen innerhalb komplexer Signalkaskaden einer streng koordinierten Aktivierung funktionell beteiligter Proteinkinasen. Die Mitglieder der Ndr-(nuclear Dbf2-related)-Serin/Threonin-Proteinkinasefamilie sowie deren Interaktionspartner sind Schlüsselproteine in Signalwegen, die wichtige zelluläre Prozesse wie Wachstum, Morphogenese, Mitose, Zytokinese und Apoptose kontrollieren (Hergovich et al., 2006). Tatsächlich konnten für die Ndr-Serin/Threonin-Kinasen Trc (Tricornered) in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und für SAX-1 (Sensory axon guidance-1) im Nematoden *Caenorhabditis elegans* Funktionen im Rahmen der Ausbildung rezeptiver Felder von sensorischen Neuronen beschrieben werden. Sie regulieren das Auswachsen und die Verzweigung von Dendriten und verhindern eine Überlappung von Dendriten sensorischer Neurone einer Klasse mit Geschwisterdendriten bzw. Dendriten benachbarter Zellen. Diese Vorgänge werden als „*self-avoidance*“ bzw. „*tiling*“ bezeichnet und verhindern somit redundante Repräsentationen sensorischer Eingangssignale (Emoto et al., 2004; Gallegos and Bargmann, 2004), (Hattori et al., 2008). Vorhergehende Studien unserer Arbeitsgruppe (Stork et al., 2004) zeigten einen verstärkenden Effekt von Ndr2, einer in Säugetieren exprimierten Ndr-Serin/Threonin-Kinase, auf das Neuritenwachstum von Zellen der neuronalen Phäochromocytom-Zelllinie PC12. In weiteren Arbeiten im Rahmen meiner Diplomarbeit konnte ich darauf aufbauend zeigen, dass diese Ndr2-vermittelte Erhöhung des Auswachsens von Neuriten zum einen kalziumabhängig ist und zum anderen durch Bestandteile der extrazellulären Matrix, insbesondere durch Kollagen IV, beeinflusst wird. PC12-Zellen binden über die Zelladhäsionsmoleküle Integrine an die extrazelluläre Matrix. Zahlreiche Studien haben bereits belegt, dass Integrine in neuronalen Zellen das Auswachsen und die Verzweigung der Neuriten regulieren. Aufgrund des Einflusses von Ndr2 auf das Neuritenwachstum von PC12-Zellen nehme ich an, dass Ndr2 abhängig von der durch Integrine vermittelten Zelladhäsion morphologische Veränderungen der Zellen reguliert. Daher sollte im Rahmen meiner Doktorarbeit die Untersuchung einer Beteiligung von Ndr2 in Integrin-Signalwegen, Aufschluss über die Funktion von Ndr2 in der Regulation neuronaler Differenzierungsprozesse geben.

Weiterhin konnte für Mitglieder der Ndr-Familie gezeigt werden, dass sie eine entscheidenden

de Rolle bei der Organisation des Aktin- und Mikrotubulizytoskeletts spielen (Tamaskovic et al., 2003; Fang and Adler, 2010). Für die säugetierspezifische Ndr2-Kinase konnte unsere Arbeitsgruppe eine Bindung an β -Aktin sowie eine Kollokalisierung mit dem zellulären Aktinzytoskelett bestätigen (Stork et al., 2004). Aufgrund dessen vermute ich, dass Ndr2 über eine Regulation der Aktinzytoskelettdynamik entscheidend an der Differenzierung von Neuronen während der Entwicklung des Nervensystems beteiligt sein könnte. Des Weiteren zeigten Expressionsdaten aus vorhergehenden Studien der Arbeitsgruppe (Stork et al., 2004; Stork et al., 2001), dass während der Konsolidierungsphase Ndr2 und β -Aktin in der basolateralen Amygdala (BLA) von furchtkonditionierten Mäusen vermehrt exprimiert werden. Zahlreiche Befunde der letzten Jahre weisen darauf hin, dass eine Polymerisation und Depolymerisation von Aktinfilamenten der Gedächtnisbildung zugrunde liegt (Lamprecht and LeDoux, 2004). Daher sollte im Rahmen meiner Doktorarbeit die Untersuchung des Einflusses einer Blockade der Aktindynamik in der BLA zum Zeitpunkt der Expressionserhöhung von Ndr2 zum einen Aufschluss darüber geben, ob eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts ebenfalls essentiell für die Bildung eines Furchtgedächtnisses ist und zum anderen auf eine mögliche Schlüsselfunktion von Ndr2 in der Regulation der Aktindynamik hinweisen.

1.1 Die Serin/Threonin-Kinase Ndr2

1.1.1 Ndr2 ist ein Mitglied der Ndr-Serin/Threonin-Kinasefamilie

Die Familie der Ndr-Serin/Threonin-Kinasen ist eine Untergruppe der AGC-Gruppe von Proteinkinasen (Pearce et al., 2010), deren Mitglieder essentielle Funktionen in einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie zum Beispiel der Zellteilung, dem Zellwachstum, der Morphogenese und der Apoptose ausüben. Die Ndr-Proteinkinasefamilie umfasst die im Säugetier vorkommenden Isoformen Ndr1 und Ndr2 (auch bekannt als Stk38 und Stk38L), sowie Lats1 und Lats2 (large tumor suppressor 1 und 2) und deren Orthologe Tricornered und Warts/Lats aus *D. melanogaster*, SAX-1 und LATS aus *C. elegans* und die in Protozoen exprimierten Ndr-Kinasen Cot-1 (*Neurospora crassa*), Orb6p, Sid2p (*Schizosaccharomyces pombe*), Cbk1p, Dbf2p und Dbf20p (*Saccharomyces cerevisiae*) (Tamaskovic et al., 2003). Die Mitglieder dieser Proteinkinasefamilie sind von der Hefe bis zum Menschen in ihrer Primärstruktur sehr stark konserviert und zeigen in ihrer Aminosäuresequenz eine Übereinstimmung zwischen 40 % und 60 %. Allen gemeinsam ist eine aus zwölf Unterdomänen aufgebaute katalytische Domäne, die zwischen den Unterdomänen VII und VIII durch eine möglicherweise in allen Ndr-Kinasen autoinhibitorisch wirkende Sequenz (AIS) und dem Aktivierungssegment (AS) unterbrochen wird. Zudem besitzen alle Ndr-Kinasen ein hydrophobes Motiv im C-Terminus sowie eine N-terminale regulatorische Domäne (NTR). Eine weitere Gemeinsamkeit aller Ndr-Kinasen stellen zwei Phosphorylierungsstellen dar, über welche die Regulation der Kinaseaktivität stattfindet (Millward et al., 1999; Hergovich et al., 2006; Hergovich et al., 2008). Während der innerhalb des AS befindliche Serinrest durch die eigene Kinaseaktivität phosphoryliert wird, vermittelt eine vorgeschaltete Serin/Threonin-Kinase die Phosphorylierung des im hydrophoben Motiv der Kinasen lokalisierten Threoninrests (Hergovich et al., 2006). Sowohl für die in Säugetieren exprimierten Isoformen Ndr1 und Ndr2 bzw. Lats1 und Lats2 konnten die Ste20-ähnlichen Kinasen Mst3 (Stegert et al., 2005) bzw. Mst1/2 (Chan et al., 2005) als Aktivatoren nachgewiesen werden. Auch für die in *D. melanogaster* und *S. pombe* vorkommenden

Ndr-Kinasen Trc und Warts bzw. Dbf2p und Dbf20p konnte gezeigt werden, dass sie durch Hippo bzw. Cdc15p - ebenfalls Mitglieder der Gruppe der Ste20-ähnlichen Kinasen - phosphoryliert werden (Emoto et al., 2006; Mah et al., 2001). Daher wird vermutet, dass die Interaktion zwischen Ste20-ähnlichen Kinasen und Mitgliedern der Ndr-Kinasefamilie stark konserviert ist. In mehrzelligen eukaryotischen Organismen (*D. melanogaster*, *C. elegans* und allen Säugetieren) besitzen die Ndr-Kinasen eine zusätzliche dritte Phosphorylierungsstelle. Für Ndr1 (Threonin⁷⁴) und Ndr2 (Threonin⁷⁵) konnte gezeigt werden, dass dieser Aminosäurerest für eine vollständige Aktivierung der Kinaseaktivität von Bedeutung ist (Stegert et al., 2004).

Ein weiteres Charakteristikum aller Ndr-Kinasen besteht in der Interaktion mit Mitgliedern der ebenfalls von der Hefe bis zum Menschen stark konservierten Mob-Proteinfamilie. Mit ihrer negativ geladenen Oberfläche binden die Mob-Proteine an die mit positiv geladenen Aminosäureresten angereicherte NTR Domäne im N-Terminus der Ndr-Kinasen (Ponchon et al., 2004). In den verschiedenen Ndr-Homologen von der Hefe bis zum Menschen konnte gezeigt werden, dass diese Interaktion die räumliche Lokalisation der Ndr-Kinasen koordiniert, so dass diese vollständig aktiviert in der Zelle agieren können (Komarnitsky et al., 1998; Frenz et al., 2000; Weiss et al., 2002; Hou et al., 2003; Hou et al., 2004; He et al., 2005b; Hergovich et al., 2005; Hergovich et al., 2006; Hergovich and Hemmings, 2008). Interessanterweise konnten Kohler und seine Kollegen zeigen, dass MOB1 die Aktivität von humanen Ndr-Kinasen stimuliert, während MOB2 als negativer Regulator der Kinasen fungiert. Diese Beobachtung steht im Widerspruch mit der von Devroe et al. (2004) gezeigten Stimulation der Kinaseaktivität humaner NDR1 und NDR2 durch MOB2. Darüber hinaus stellten Kohler et al. (2010) fest, dass MOB3, auch bekannt unter der Bezeichnung Phocoin, nicht mit den vier humanen Ndr-Kinasen interagiert. Die genaue Regulation von Kinasen der Ndr-Familie durch Mob-Proteine in Säugetieren bedarf daher weiterer Klärung.

Weiterhin gibt es eine Gruppe von Proteinen, die zu der Furry-Proteinfamilie gehören und ebenfalls die Funktion der Ndr-Kinasen Cbk1p, Orb6p, Trc, Warts, SAX-1 und LATS1/2 regulieren. Dabei handelt es sich in der Hefe um Tao3p und Mor2p, in der Fruchtfliege um Furry und Salvador, im Nematoden um SAX-2 und im Menschen um hWW45, auch bekannt als Furry-Homolog1. Es wird vermutet, dass diese Proteine über ihre Funktion als Gerüstbausteine innerhalb größerer Proteinkomplexes die Bindung der Ndr-Kinasen an ihre jeweilige Ste20-ähnliche Kinase vermitteln und so an deren Aktivierung mitwirken (Hergovich et al., 2006). Es stellt sich folglich die Frage, ob die in Säugetieren vorkommenden Kinasen Ndr1 und Ndr2 ebenfalls über derartige Gerüstproteine reguliert werden. Aufgrund der hohen Konservierung ihrer Primärstruktur und ihrer Interaktionspartner liegt es nahe anzunehmen, dass ein ebenfalls stark konservierter Aktivierungsmechanismus für alle Mitglieder der Kinasefamilie existiert (Hergovich et al., 2006; Hergovich et al., 2008).

1.1.2 Ndr2 besitzt neben einer Bindungsstelle für Mob eine weitere für das kalziumbindende Protein S100

Die in der Maus und im Menschen exprimierten Ndr2-Kinasen stimmen über 90% in ihrer Primärsequenz überein. Dabei sind insbesondere die für die Aktivierung der Kinasen essentiellen Phosphorylierungsstellen zwischen der humanen und der murinergen Form (siehe Abb. 1.1) identisch und ihr Aktivierungsweg zwischen Mensch und Maus hoch

konserviert (Stegert et al., 2004; Hergovich et al., 2006). Innerhalb ihrer Primärstruktur besitzt die humane NDR2-Kinase in ihrer N-terminalen regulatorischen (NTR) Domäne neben einer Bindungsstelle für MOB1A/B bzw. MOB2 (Devroe et al., 2004; Bichsel et al., 2004) eine Erkennungssequenz für das kalziumbindende Protein S100 (Stegert et al., 2004). Aus diesem Grund wird diese Region auch als SMA-Domäne bezeichnet (S100- und Mob-assoziierte-Domäne). Die S100-Proteinfamilie, deren zwanzig Mitglieder entweder als Homo- oder als Heterodimer *in vivo* vorliegen, gehört wie Calmodulin zu den EF-Hand-kalziumbindenden Proteinen. Die im Nervensystem am häufigsten vorkommenden S100-Dimere sind zum einen ein Homodimer aus S100B sowie zum anderen ein Heterodimer aus S100A1 und S100B (Zimmer et al., 2005). Beide Isoformen S100B und S100A1 sind der Lage an die NTR-Domäne von Ndr2 zu binden. In ihrer S100-Bindungsregion besitzt die NDR2-Kinase zudem mit dem Aminosäurerest Threonin⁷⁵ eine Autophosphorylierungsstelle, dessen Bedeutung allerdings noch nicht im Detail geklärt werden konnte. Eine Mutation dieser Autophosphorylierungsstelle führt jedoch zu einer verminderten Aktivierung der Kinaseaktivität. Stegert et al. (2004) vermuten, dass die Autophosphorylierung dieses Restes für die Interaktion von S100 und NDR2 relevant ist. Threonin⁷⁵ ist zwar nicht direkt an der Bindung von S100 an NDR2 beteiligt, könnte aber durch seine Autophosphorylierung die Affinität zwischen den beiden Interaktionspartnern erhöhen. Neben Threonin⁷⁵, besitzt NDR2 zwei weitere Phosphorylierungsstellen. Das im Aktivierungssegment der katalytischen Domäne gelegene Serin²⁸² wird ebenso durch die eigene Kinaseaktivität phosphoryliert. Threonin⁴⁴² im hydrophoben Motiv des C-Terminus von NDR2 wird dagegen von der Ste20-ähnlichen Kinase MST3 erkannt und phosphoryliert (Stegert et al., 2005). Innerhalb der katalytischen Domäne besitzt die NDR2-Kinase eine direkt neben dem Aktivierungssegment gelegene mit basischen Aminosäuren angereicherte Region, die sogenannte „autoinhibitorische Sequenz“ (AIS). Die Gruppe von Brain Hemmings konnte in ihren Arbeiten von 2004 und 2005 zeigen (Bichsel et al., 2004; Stegert et al., 2005), dass diese Region hemmend auf die Autophosphorylierung von Serin²⁸² wirkt. Die beiden Aminosäurereste Serin²⁸² und Threonin⁴⁴² sind unter den Mitgliedern der Ndr-Kinasefamilie hoch konserviert und für die Aktivierung von NDR2 essentiell, da eine Mutation beider Reste zu einem fast vollständigen Verlust der Kinaseaktivität führt. Des Weiteren induziert der Phosphatase-2A-Inhibitor Okadainsäure durch die Phosphorylierung dieser beiden Aminosäurereste eine Steigerung der Kinaseaktivität, was im Gegenzug auf eine Regulation der Aktivität von NDR2 mittels einer Dephosphorylierung von Serin²⁸² und Threonin⁴⁴² durch die Phosphatase 2A hinweist (Stegert et al., 2004).

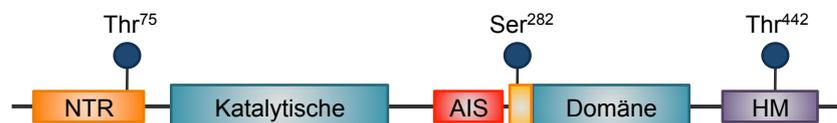


Abbildung 1.1: Struktur von Ndr2

Ndr2 (murin) besitzt neben einer katalytischen Domäne vier weitere für dessen Kinaseaktivität essentielle Bereiche, die N-terminale regulatorische Domäne (NTR), das im C-Terminus sich befindende hydrophobe Motiv (HM) sowie die katalytische Domäne unterbrechende autoinhibitorische Sequenz (AIS) und das unmittelbar darauf folgende Aktivierungssegment (gelb markiert). Innerhalb dieser Domänen besitzt Ndr2 drei Phosphorylierungsstellen. Während Threonin⁷⁵ (Thr⁷⁵) sowie Serin²⁸² (Ser²⁸²) durch die eigene Kinaseaktivität phosphoryliert werden, wird Threonin⁴⁴² (Thr⁴⁴²) durch die Mst3-Kinase phosphoryliert.

1.1.3 Ndr2 wird an der Plasmamembran aktiviert

Für die beiden humanen Isoformen NDR1 und NDR2 konnte eine Erhöhung der Kinaseaktivität durch eine Bindung von S100 Proteinen innerhalb der NTR-Domäne nachgewiesen werden (Millward et al., 1998; Stegert et al., 2004), jedoch ist dieser Mechanismus bei den anderen Mitgliedern der Ndr-Kinasefamilie bislang noch nicht untersucht worden. Aufgrund der hochgradigen Konservierung der NTR-Domäne der einzelnen Ndr-Kinasen wird jedoch vermutet, dass diese Art der kalziumabhängigen Aktivierung von der Hefe bis zum Menschen ähnlich abläuft (Hergovich et al., 2006; Bhattacharya et al., 2003). Auch die Interaktion mit Mob-Proteinen und der dadurch induzierte Aktivierungsmechanismus ist bisher für die humanen NDR1- bzw. NDR2-Kinasen am besten untersucht worden. Anhand von Beobachtungen aus Mutationsstudien entwickelte die Gruppe von Brain Hemmings daher folgendes Modell des Aktivierungssignalweges von Ndr2 in Säugetieren (siehe Abb. 1.2): Im Zytoplasma lokalisiert binden Mob1 sowie das kalziumbindende Protein S100 an die N-terminale regulatorische Domäne von Ndr2. Dabei erhöht eine Autophosphorylierung von Threonin⁷⁵ die Affinität zwischen S100 und der Ndr-Kinase. Hemmings und seine Kollegen vermuten nun, dass durch die Interaktion mit Mob1 ein Konformationswechsel in Ndr2 induziert wird, so dass der hemmende Einfluss der autoinhibitorischen Sequenz (AIS) auf den Aminosäurerest Serin²⁸² im Aktivierungssegment aufgehoben wird und dieser durch die eigene Kinaseaktivität autophosphoryliert werden kann (Bichsel et al., 2004; Stegert et al., 2005).

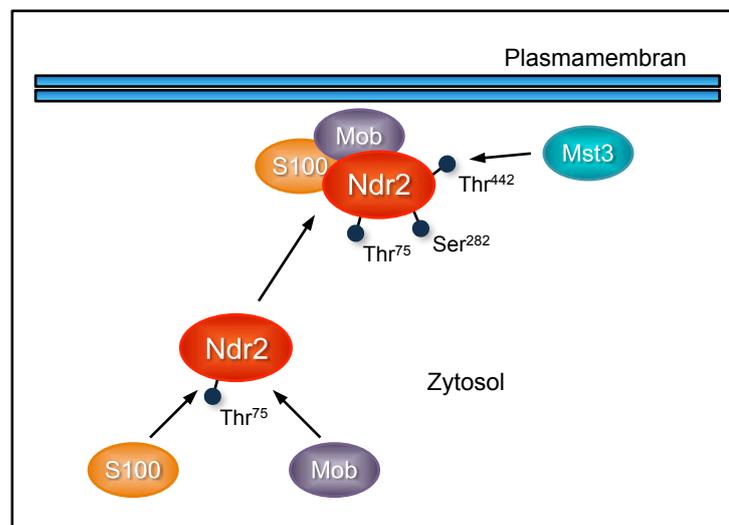


Abbildung 1.2: Modell des Aktivierungssignalweges von Ndr2

Im Zytoplasma binden die Proteine S100 und Mob an die NTR-Domäne von Ndr2. Die Interaktion mit Mob induziert einen Konformationswechsel der Kinase, so dass der Serinrest (Ser²⁸²) autophosphoryliert wird. Des Weiteren vermittelt Mob eine Translokation von Ndr2 an die Plasmamembran. Dort lokalisiert, wird der Threoninrest (Thr⁴⁴²) durch die Mst3 Kinase phosphoryliert und Ndr2 vollständig aktiviert.

Diese Annahme passt zu den von Bhattacharya et al. (2003) mithilfe einer Kernspinresonanzspektroskopie gewonnenen Strukturdaten, die zeigen, dass die Bindung von S100B an die humane NDR1 einen Konformationswechsel in der katalytischen Domäne der Kinase

induziert, wodurch es zu einer Aufhebung der Autoinhibition des Aktivierungssegments kommt. Aufgrund dieser Beobachtung stellt sich allerdings die Frage, ob bereits die Bindung eines Interaktionspartners - Mob bzw. S100 - ausreicht, oder ob die Bindung beider Proteine an die NTR-Domäne von Ndr2 nötig ist, um eine Induktion der Autophosphorylierung von Serin²⁸² im Aktivierungssegment zu vermitteln. Essentiell für eine vollständige Kinaseaktivität von Ndr2 ist jedoch der durch die Bindung von Mob vermittelte Transport des Proteinkomplexes an die Plasmamembran (Hergovich et al., 2005). Dort phosphoryliert die in den gemeinsamen Signalkaskaden oberhalb von Ndr2 agierende Mst3-Kinase den im hydrophoben Motiv liegenden Aminosäurerest Threonin⁴⁴² (Stegert et al., 2005). Somit liegt Ndr2 erst an der Plasmamembran in der vollständig aktivierten Form vor (Hergovich et al., 2005).

1.1.4 Expression und zelluläre Lokalisation von Ndr2

In Säugetieren wird Ndr1 in großer Menge in der Milz, in der Lunge, im Thymus, im Fett- und Muskelgewebe sowie im Gehirn exprimiert wird, während Ndr2 in den Organen des Gastrointestinaltrakts, im Herzen, in den Nieren, in den Hoden sowie ebenfalls im Thymus und im Gehirn stark angereichert vorliegt (Stegert et al., 2004; Devroe et al., 2004; Millward et al., 1995; Stork et al., 2004). Mithilfe einer *in situ* Hybridisierung analysierte unsere Arbeitsgruppe die Verteilung von Ndr2 im Gehirn der Maus. Dabei wurde festgestellt, dass Ndr2 zwar im gesamten Gehirn vorkommt, jedoch besonders stark im Neokortex, im basalem Vorderhirn, im Hippokampus (insbesondere in der CA3-Region), in der Amygdala, im Cerebellum sowie in verschiedenen Kernen des Hirnstamms exprimiert wird. Eine Betrachtung der Verteilung von Ndr2 auf zellulärer Ebene offenbarte eine Expression des Proteins sowohl in kortikalen und hippokampalen Pyramidenzellen, als auch in den Körnerzellen des Gyrus dentatus und den Purkinjezellen des Cerebellums. Darüber hinaus kommt Ndr2 in der Amygdala stark angereichert in pyramidalen Neuronen der Klasse I sowie im Hippokampus in Interneuronen der Regionen des Stratum oriens, des Stratum radiatum und des Hilus vor. Für eine Untersuchung der intrazellulären Verteilung der Kinase transfizierten Stork et al. (2004) PC12-Zellen und kortikale Primärneurone mit einem EGFP-Ndr2-kodierenden-Expressionsvektor. Dabei konnten sie eine zytosolische Verteilung von EGFP-Ndr2 im Zellkörper und in den Neuriten der Zellen beobachten. Ein Pull-down-Assay zeigte, dass Ndr2 *in vitro* direkt an β -Aktin bindet. Über eine Phalloidin-Rhodamin-Färbung der Aktinfilamente beobachteten sie zudem, dass Ndr2 mit dem Aktinzytoskelett sowohl in den Somata als auch in auswachsenden und damit in ihrer Form dynamischen Strukturen wie den Neuriten, Filopodien und Wachstumskegeln von PC12-Zellen sowie den Dendriten, Axonen und Spines kortikaler Neurone kolokalisiert. Eine mutierte Form des Fusionsproteins EGFP-Ndr2, in der eine Doppelmutation in den beiden aktivitätsregulierenden Phosphorylierungsstellen Serin²⁸² und Threonin⁴⁴² von Ndr2 vorlag, zeigte im Vergleich zu der nativen Form von Ndr2 keinen Unterschied in ihrer zellulären Verteilung weder in PC12-Zellen noch in kortikalen Neuronen.

Unsere Arbeitsgruppe konnte in ihrer Studie aus dem Jahre 2004 des Weiteren nachweisen, dass Ndr2 in der basolateralen Amygdala von furchtkonditionierten Mäusen sechs Stunden nach dem Training vermehrt exprimiert wird. Dabei kehrt die Expression von Ndr2 innerhalb von 24 Stunden nach der tonassozierten Furchtkonditionierung wieder auf das Ausgangsniveau zurück. Diese lerninduzierte Expressionsregulation von Ndr2 in der basolateralen Amygdala sowie die Interaktion von Ndr2 mit β -Aktin lassen daher

auf eine Beteiligung der Kinase an der Reorganisation des Aktinzytoskeletts während zellmorphologischer Veränderungen von Neuronen im Rahmen von Differenzierungs- und Plastizitätsvorgängen innerhalb des zentralen Nervensystems schließen.

1.1.5 Ndr-Kinasen üben wichtige Funktionen zur Regulation des Zellzyklusses, der Zellproliferation und der Apoptose aus

Wachstum und Morphogenese sind komplex ablaufende Zellprozesse, die zudem eng mit dem Zellzyklus verknüpft sind. Mitglieder der Ndr-Kinasefamilie und ihre Interaktionspartner stellen Schlüsselproteine für die Regulation dieser Prozesse, insbesondere der Zellproliferation, der Apoptose, dem gezielten Abschluss der mitotischen Endphase sowie des polarisierten Zellwachstums dar.

In niedrigeren eukaryotischen Organismen wie den Hefepilzen *S. cerevisiae* und *S. pombe* sowie dem Schlauchpilz *N. crassa* üben die Ndr-Kinasen und ihre Interaktionspartner während der Morphogenese und der Zytokinese wichtige Funktionen in der Aufrechterhaltung der Zellform und der Zellpolarität, in der Organisation des Aktin- und Mikrotubulizytoskeletts sowie im gezielten Abschluss der mitotischen Endphase und der Trennung von Tochter- und Mutterzelle aus (McCollum and Gould, 2001; Brace et al., 2011; Nelson et al., 2003; Ray et al., 2010; Dvash et al., 2010; Ziv et al., 2009). Aufgrund ihrer starken evolutionären Konservierung wird vermutet, dass die Mitglieder der Ndr-Kinasefamilie auch in evolutionär weit entfernten Organismen ähnliche Funktionen ausüben (Tamaskovic et al., 2003; Hergovich et al., 2006).

Tatsächlich konnte eine Rolle der Kinasen NDR1 sowie LATS1 und LATS2 auch während der Teilung von humanen Zellen beobachtet werden. Sie regulieren die Duplikation des Zentrosoms während der DNA-Synthese-Phase (Hergovich et al., 2009) sowie innerhalb der Metaphase die Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialebene und nehmen somit Einfluss auf die Beendigung der Mitose (Bothos et al., 2005; Yabuta et al., 2007). Des Weiteren agieren die Ndr-Kinasen in höher entwickelten Organismen als Tumorsuppressoren und kontrollieren somit die Bildung neuer Zellen sowie das Absterben von Zellen. Eine Balance zwischen der Zellproliferation und der Apoptose (programmierter Zelltod) ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Gewebeintegrität der Organe. Kommt es zu Fehlern innerhalb dieser Prozesse, führt dies in fast allen Fällen zu einer krebsartigen Gewebeneubildungen (Green and Evan, 2002). Sowohl in der Fruchtfliege als auch in der Maus geht ein Verlust von Wats bzw. Lats1 mit einer erhöhten Zellproliferation und der Ausbildung von Tumoren einher. Dabei weisen insbesondere Lats1-defiziente Mäuse eine verstärkte Ausbildung von Bindegewebs Sarkomen sowie Ovarialtumoren auf (Xu et al., 1995; Xu et al., 1995; St John et al., 1999). Weiterhin konnte in tumorartigem Gewebe von Mäusen eine einhergehende Verringerung des Proteingehaltes von Lats1 bzw. Lats2 beobachtet werden (Jiménez-Velasco et al., 2005; Takahashi et al., 2005). In *D. melanogaster* fungiert die Ndr-Kinase Warts im Salvador-Warts-Hippo-Signalweg (SWH-Signalweg), der über eine Induktion der Apoptose sowie einer Inhibierung des Zellwachstums und der Zellproliferation die Größe der Organe kontrolliert. Interessanterweise sind die in der Maus bzw. im Menschen exprimierten Proteine Sav1 (Salvador Homolog 1), Mst1/2, Lats1/2 und Mob1A Homologe der im SWH-Signalweg vorkommenden Proteine Sav, Hippo, Warts und Mats. Dies lässt darauf schließen, dass der SWH-Signalweg zwischen Invertebraten und Säugetieren stark konserviert ist. Über eine Regulation der Zellproliferation und der Apoptose trägt er demzufolge zur Größe und Gewebeintegrität von Organen bei und verhindert in diesem

Zusammenhang auch die Bildung von Tumoren. Diese Annahme wird durch Beobachtungen von Vichalkovski et al. (2008) gestützt, dass die humanen Ndr-Kinasen NDR1 und NDR2 intrazelluläre Signale in der durch eine Aktivierung des Fas-Rezeptors induzierten Apoptose vermitteln. Sie konnten somit zeigen, dass in Säugetieren neben Lats1 und Lats2 auch Ndr1 bzw. Ndr2 als proapoptotische Kinasen agieren. Diese Beobachtung korreliert mit den Phänotypen, die Ndr1-defiziente Mäuse aufweisen. Homozygote ($Ndr1^{-/-}$) sowie heterozygote ($Ndr1^{+/-}$) Mäuse zeigten eine gegenüber den Wildtyp-Kontrolltieren erhöhte Wahrscheinlichkeit, T-Zell-Lymphome auszubilden. Zudem konnten Cornils et al. (2010) beobachten, dass in einigen Geweben eine verringerte Menge bzw. ein Verlust von Ndr1 durch eine Erhöhung des Proteingehaltes der zweiten Isoform, Ndr2, kompensiert wird. Dies lässt sich aber nicht auf eine Expressionssteigerung oder eine verlängerte Halbwertszeit von Ndr2 zurückführen, so dass Vieles auf eine Regulation der mRNA von Ndr2 durch posttranskriptionale Mechanismen hindeutet. Im Gegensatz zum Thymus, der Bauchspeicheldrüse und dem Darmepithel kommt es hingegen in den Lymphknoten von $Ndr1^{-/-}$ und $Ndr1^{+/-}$ Mäusen zu keiner Kompensation durch eine Veränderung des Ndr2-Proteinlevels. Eine Verringerung der Proteinmenge von Ndr1 geht in den Lymphknoten mit einem verminderten Gehalt an Ndr2 einher. Bei einer Reduktion beider Isoformen kommt es – wohl durch den Verlust ihrer proapoptotischen Wirkung – im Lymphsystem zu einer vermehrten Bildung von Tumoren (Cornils et al., 2010).

1.1.6 Ndr2 und seine Homologe regulieren neuronale Differenzierungsvorgänge

Neben den bereits genannten Funktionen im Rahmen des Zellzyklus, der Zellproliferation und der Apoptose üben Ndr-Kinasen eine wichtige Rolle in der Kontrolle des polarisierten Zellwachstums aus. In einzelligen Organismen, welche eine hohen Proliferationsrate aufweisen, scheinen die Ndr-Kinasen in Wachstumsprozessen innerhalb des Zellzyklus eingebunden zu sein (Bidingmaier et al., 2001), während die Mitglieder der Ndr-Kinasefamilie in mehrzelligen Organismen wie der Fruchtfliege *D. melanogaster* und dem Nematoden *C. elegans* auch in komplexeren Wachstumsprozessen involviert sind. Dabei regulieren sie in der Fliege die Morphologie von epidermalen Extensionen wie die Flügelhaare und die sensorischen Borsten (Geng et al., 2000; He et al., 2005a), aber auch das Auswachsen und die Verzweigung der Dendriten von Nervenzellen in beiden der genannten Invertebraten (Emoto et al., 2004; Gallegos and Bargmann, 2004).

Sowohl in der Hefe als auch in der Fruchtfliege konnte gezeigt werden, dass Ndr-Kinasen während morphologischer Wachstumsprozesse an der Reorganisation des Aktinzytoskeletts beteiligt sind (Fang and Adler, 2010; Das et al., 2009). Auch die säugetierspezifische Ndr2-Kinase bindet an β -Aktin (siehe Abs. 1.1.4). Daher wird einerseits vermutet, dass die Regulation der Aktinfilamentdynamik während struktureller Wachstumsprozesse eine evolutionär konservierte Funktion der Ndr-Kinasen darstellt, und andererseits, dass Ndr-Kinasen, im besonderen Ndr2, auch in höher entwickelten Säugetieren an der Differenzierung neuronaler Zellen beteiligt sind (Stork et al., 2004).

Im Gegensatz zu dem bereits erwähnten Prozess „*self-avoidance*“ (engl. für „Selbstabwendung“) durch den eine Überlappung von Geschwisterneuronen verhindert wird, stellt das „*tiling*“ (engl. „Kachelung“) einen Vorgang dar, welcher die Überlagerung von Dendritenarmen benachbarter Zellen der gleichen Klasse blockiert. Durch diese beiden Prozesse wird die Ausbildung der rezeptiven Felder, die sich über die Innervierung einer bestimmten Re-

gion eines Organs bzw. Gewebes durch ein sensorisches Neuron definieren, gewährleistet (Hattori et al., 2008). In einigen Arbeiten, zum Beispiel von Emoto et al. (2004), werden anstelle der Begriffe „*self-avoidance*“ und „*tiling*“ die Bezeichnungen „*iso-neuronal tiling*“ bzw. „*hetero-neuronal tiling*“ verwendet und daher oft ganz allgemein unter „*tiling*“ zusammengefasst. Das in *D. melanogaster* vorkommende Protein Tricornered kontrolliert zusammen mit dem Gerüstprotein Furry zum einen die Verzweigung, zum anderen aber auch mittels *tiling* und *self-avoidance* die Ausbreitung der Dendritenfelder von sensorischen Nervenzellen der Klasse IV. Emoto und Kollegen (2004) konnten beobachten, dass ein vollständiger Verlust von Tricornered bzw. dessen Koaktivator Furry zu einer erhöhten Verzweigung und einer Überlappung von Geschwister-Dendritenzweigen sowie von Dendriten benachbarter Zellen führt. Emoto et al. (2004) schlugen vor, dass Tricornered zusammen mit Furry bei der Kontrolle der Dendritenverzweigung - aber nicht für das *tiling* der Dendriten - die GTPase Rac, welche über den LIM-Kinase-Signalweg die Polymerisation von Aktinfilamenten stimuliert, negativ reguliert. Aufbauend auf diesen Befunden beschreiben Koike-Kumagai et al. in ihrer Arbeit aus dem Jahr 2009, dass der Multiproteinkomplex TORC2 (Target of rapamycin complex 2), bestehend aus der Serin/Threonin-Kinase TOR (Target of rapamycin) sowie unter anderem Sin1 und Rictor, ebenso wie auch Tricornered die Mechanismen des *tiling* bzw. der *self-avoidance* der Dendriten sensorischer Neurone der Klasse IV kontrolliert. Aufgrund einer durch RNAi induzierten Inhibierung der Expression von TOR, Sin1 und Rictor einhergehenden Verringerung der Phosphorylierung des im hydrophoben Motiv von Tricornered lokalisierten Thr-Aminosäurerestes Thr⁴⁴⁹ vermuten die Autoren, dass der TORC2-Komplex die Aktivierung der Ndr-Kinase reguliert. Darüber hinaus konnte sowohl in der Hefe als auch in Säugetierzellen für den hoch konservierten TORC2-Proteinkomplex eine essentielle Rolle in der Regulation der Dynamik des Aktinzytoskeletts innerhalb von Wachstumsprozessen gezeigt werden (Hall, 2008). Infolgedessen vermuten Kumagai und Kollegen, dass eine Aktivierung des Tricornered-Signalweges über TORC2 die Verzweigung und Ausbreitung der Dendriten sensorischer Neurone über eine Reorganisation von Aktinfilamenten kontrolliert. Demgegenüber konnte für die zweite in *D. melanogaster* exprimierte Ndr-Kinase Warts eine Bedeutung für die Aufrechterhaltung des dendritischen Verzweigungsmusters sensorischer Neurone belegt werden. Ein Verlust der Funktion von Warts führte zu einer Reduktion der Verzweigungen sowie zu einer Verkürzung der Dendriten. Diese Beobachtung legt nahe, dass Warts parallel zum Tricornered-vermittelten Signalweg die Ausbildung der dendritischen Felder kontrolliert (Emoto et al., 2006).

Die in *C. elegans* vorkommende Ndr-Kinase SAX-1 reguliert ähnlich wie deren Homolog Trc in *D. melanogaster* durch ein kontrolliertes Beenden des Neuritenwachstums das *tiling* der Dendriten von mechanosensorischen Neuronen (Gallegos and Bargmann, 2004). Eine dominant negative Mutation im Gen für RhoA verursacht in *C. elegans* die gleichen Veränderungen in der Form neuronaler Zellen wie eine Mutation im Gen für SAX-1. Basierend auf diesen sich ähnelnden Funktionen beider Proteine wird vermutet, dass RhoA und SAX-1 gemeinsame Funktionen in der Regulation der Aktinzytoskelettdynamik im Rahmen von Wachstumsprozessen besitzen (Zallen et al., 2000).

Für Säugetiere jedoch wurde die Rolle von Ndr-Kinasen während des Auswachsens und der Verzweigung der Dendriten und Axone von Neuronen des zentralen Nervensystems (ZNS) bisher nicht beschrieben. Die säugetierspezifische Ndr2-Kinase wird im Gehirn von Mäusen vorwiegend in exzitatorischen Projektionsneuronen exprimiert (siehe Abs. 1.1.4). Sowohl in vorhergehenden Arbeiten der Gruppe Stork et al. (2004) als auch in eigenen

Studien, konnte ein verstärkender Effekt von Ndr2 auf das Neuritenwachstum von Zellen der aus der Ratte stammenden und neuronal differenzierenden Phäochromocytom-Zelllinie PC12 beobachtet werden. Diese Ndr2-vermittelte Erhöhung des Auswachsens von Neuriten ist zum einen abhängig von einer vollständigen Aktivierung der Kinaseaktivität, da eine phosphorylierungs-inaktive Form von Ndr2, in der die beiden Phosphorylierungsstellen Serin²⁸² und Threonin⁴⁴² nach einem Basenaustausch mutiert vorlagen, keine Steigerung des Neuritenlängenwachstums zeigte. Zum anderen konnte eine Abhängigkeit von der extrazellulären Kalziumkonzentration beobachtet werden, da durch eine Verringerung der Konzentration der Ionen im Medium ein Ndr2-vermitteltes Wachstum der Neuriten vollständig aufgehoben werden konnte (Abb. 1.3). Dies deutet darauf hin, dass Ndr2 in seiner bekannten Abhängigkeit von einer Aktivierung durch das kalziumbindende Protein S100 (siehe Abs. 1.1.2) das Neuritenlängenwachstums von PC12-Zellen reguliert.

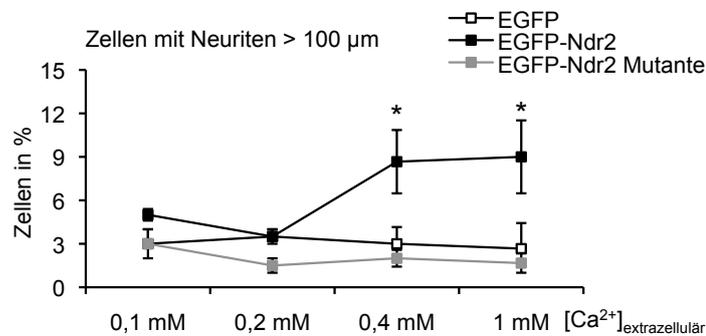


Abbildung 1.3: Erhöhung des Neuritenlängenwachstums von Ndr2-transfizierten PC12-Zellen EGFP-Ndr2 ist abhängig von der extrazellulären Kalziumkonzentration Eine Anhebung der physiologischen Konzentration freier Kalziumionen im Medium von 0,4 mM auf 1 mM hatte keinen Einfluss auf das Ndr2-vermittelte Wachstum der Neuriten, jedoch führte eine Reduktion der Kalziumkonzentration durch die Zugabe des Kalzium-Chelators EGTA auf 0,1 mM bzw. 0,2 mM zu einer Blockierung der Ndr2-induzierten Erhöhung des Neuritenlängenwachstums von PC12-Zellen. Interessanterweise, zeigten PC12-Zellen welche eine phosphorylierungs-inaktive Form der Kinase EGFP-Ndr2 Mutante überexprimierten zum einen keine Steigerung der Zahl an Zellen diese Neuriten mit über 100 µm Länge ausbildeten und zum anderen keine Abhängigkeit von der Konzentration freier Kalziumionen im Medium. Die Werte sind dargestellt als MW ± SFM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ im Vergleich zu EGFP oder EGFP-Ndr2 Mutante

Zudem zeigte die Analyse der PC12-Zellen (siehe Abb. 1.4) Differenzierungsunterschiede auf unterschiedlichen Bestandteilen der extrazellulären Matrix wie Fibronectin, Laminin sowie Kollagen I und IV insbesondere eine Reduzierung des Neuritenlängenwachstums in Ndr2-transfizierten Zellen auf dem für PC12-Zellen natürlichen Substrat Kollagen IV (Tomasselli et al., 1988). Die Adhäsion der Zellen an dieses Strukturprotein wird über die in der Zellmembran von PC12-Zellen vorkommenden $\alpha1\beta1$ -Integrine vermittelt, so dass vermutet werden kann, dass die Funktion von Ndr2 zur Regulation des Auswachsens von Neuriten abhängig von einer Integrin-vermittelten Zelladhäsion ist. Ergänzend zu dieser Beobachtungen weist die von Stork et al. (2004) gezeigte Bindung der Ndr2-Kinase an β -Aktin darauf hin, dass Ndr2 vermutlich über eine Regulation der Aktinzytoskelettdynamik und einer über Integrine vermittelten Zelladhäsion entscheidend an der Differenzierung von Neuronen während der Entwicklung des Nervensystems beteiligt ist.

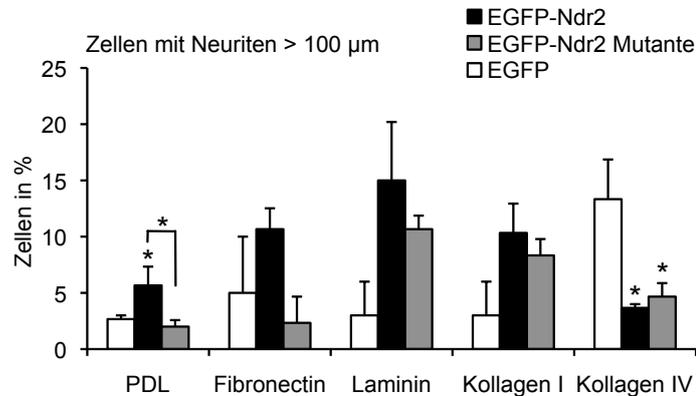


Abbildung 1.4: In EGFP-Ndr2-transfizierten PC12-Zellen wurde die Kollagen IV-vermittelte Induktion des Neuritenlängenwachstums blockiert.

Eine Betrachtung des Neuritenlängenwachstums Ndr2-transfizierter PC12-Zellen auf unterschiedlichen Bestandteilen der extrazellulären Matrix zeigte, dass nur auf PDL eine Stimulation des Wachstums von Neuriten zu beobachten war. Hingegen führt eine über $\alpha1\beta1$ -Integrine vermittelte Adhäsion der Zellen auf Kollagen IV zu einer Reduktion des Neuritenlängenwachstums von EGFP-Ndr2 und EGFP-Ndr2 Mutante exprimierenden PC12-Zellen. Die Werte sind dargestellt als MW \pm SFM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ im Vergleich zu EGFP

1.2 Das Zytoskelettprotein Aktin

1.2.1 Das Aktinzytoskelett in Neuronen des ZNS

Aktin ist eines der Hauptbestandteile des zellulären Zytoskeletts und hat essentiellen Anteil an der Formgebung sowie der Aufrechterhaltung der zellulären Morphologie. Für Säugetiere sind sechs verschiedene Aktin-Isoformen beschrieben, die wiederum in die drei Klassen α -Aktin, β -Aktin und γ -Aktin eingeteilt werden, wobei α -Aktin nur im Muskelgewebe exprimiert wird (Khaitlina, 2001). In der Zelle liegt Aktin in zwei Formen vor, einerseits als globuläre Aktinmonomere (G-Aktin) und andererseits als Aktinfilamente (F-Aktin), die sich als Doppelstrang-Helix aus den G-Aktin-Monomeren asymmetrisch zusammensetzen. Aufgrund der schwachen nichtkovalenten Bindung der Monomere unterliegen die Filamente durch ständige Anlagerung und ständigen Abbau von Monomeren einer hohen Dynamik (Pollard and Borisy, 2003). Schlüsselregulatoren dieser Aktinfilamentdynamik sind die GTPasen der Rho-Familie, darunter Cdc42, RhoA und Rac, die über Serin/Threonin-Kinasen die Aktivierung bzw. Deaktivierung von Aktin-polymerisierenden bzw. -depolymerisierenden Proteinen vermitteln (Hall and Lalli, 2010).

Über die Reorganisation des Aktinzytoskeletts wird eine große Anzahl zellulärer Prozesse vermittelt, wie u. a. die Zellmorphogenese, die Zellteilung, die Migration und der intrazellulärer Proteintransport. In sich entwickelnden Neuronen werden über die Dynamik der Aktinfilamente auch das Wachstum und die Verzweigung von Axonen und Dendriten sowie die Ausbildung von Spines (engl. für Dornen) induziert und kontrolliert (Hall and Lalli, 2010; Yoshihara et al., 2009). In axonalen Wachstumskegeln regulieren zum Beispiel die Rho-GTPasen über die Aktivität von Aktinfilament-stabilisierenden bzw. -

destabilisierenden Proteinen wie Arp2/3 (actin related protein 2/3) oder Cofilin die Ausbildung von Filopodien und Lamellipodien (Heasman and Ridley, 2008). Eine Kontrolle der strukturellen Reorganisation von Aktinfilamenten durch die RhoGTPasen Rho, Rac und Cdc42 ist ebenso wichtig für die Differenzierung von Dendriten (Threadgill et al., 1997). Die Serin/Threonin-Kinase Pak1 (p21 activated kinase 1) wird zum Beispiel über Cdc42 aktiviert und reguliert in exzitatorischen Neurone die Dendritenverzweigung sowie die Bildung von Spines (Hayashi et al., 2007). Aber auch in ausgereiften Neuronen unterliegt das Aktinzytoskelett in einigen Bereichen wie den Synapsen einer hohen Dynamik. Insbesondere die postsynaptischen dendritischen Spines zeichnen sich durch einen hohen Aktinanteil aus. In diesen Strukturen kommt es durch eine Polymerisation bzw. Depolymerisation von Aktinfilamenten zu Veränderungen der Zytoarchitektur, die der synaptischen Plastizität zugrunde liegen (Honkura et al., 2008; Matus, 2005; Dillon and Goda, 2005). Diese Aktin-vermittelte strukturelle Neu- bzw. Umbildung von Spines stellt somit eine der zellulären Grundlagen von Lernvorgängen und der Gedächtnisbildung im adulten Gehirn dar (Lamprecht and LeDoux, 2004).

1.2.2 Im zentralen Nervensystem beruhen Lern- und Gedächtnisprozesse auf der Dynamik des Aktinzytoskeletts

Die klassische Konditionierung geht auf den russischen Physiologen Iwan Pawlow zurück und dient als Modell des assoziativen Lernens. Bei der Furchtkonditionierung lernt das Tier einen zunächst neutralen konditionierten Stimulus (CS) mit einem in engem zeitlichen Bezug präsentierten aversiven unkonditionierten Stimulus (US) zu assoziieren. Als Folge wiederholter aufeinanderfolgender Präsentationen beider Stimuli bildet sich ein Langzeitgedächtnis aus, so dass in der Folge der CS auch bei alleiniger Präsentation eine – nun konditionierte – Furchtreaktion hervorruft. Das zum limbischen System gehörende Kerngebiet die Amygdala bildet eine wichtige neuronale Schlüsselstruktur für die Furchtkonditionierung, da sie sensorische und affektive Informationen aus verschiedenen kortikalen und subkortikalen Arealen integriert (LeDoux, 2000). Insbesondere im basolateralen Komplex der Amygdala (BLA) konvergieren die Informationen über den konditionierten und den unkonditionierten Stimulus und es wird daher angenommen, dass dort eine Assoziation beider Stimuli auf neuronaler Ebene gebildet wird (Stoppel et al., 2006; Maren and Quirk, 2004).

Mithilfe der klassischen Furchtkonditionierung wurden in früheren Studien unserer Arbeitsgruppe Kandidatengene isoliert, welche eine mögliche Rolle bei der Gedächtnisbildung spielen könnten. So konnten in der BLA von Mäusen sechs Stunden nach dem Training eine Expressionserhöhung der β -Isoform des Zytoskelettproteins Aktin beobachtet werden, während die Isoform γ -Aktin eine schwach verringerte mRNA Expression zeigte (Stork et al., 2001). Beide Isoformen β - und γ -Aktin bilden die in den Neuronen vorkommenden Aktinfilamente, üben dabei jedoch unterschiedliche Funktionen aus. Während β -Aktin das Auswachsen und die Beweglichkeit von neuronalen Fortsätzen zum Beispiel Spines fördert, werden diese Prozesse durch γ -Aktin inhibiert (Gunning et al., 1997). Interessanterweise konnten Stork et al. (2004) ebenfalls eine erhöhte Expression der Serin/Threonin-Kinase Ndr2 sechs Stunden nach einer Furchtkonditionierung in der BLA von Mäusen messen. Die gleichzeitige erhöhte Transkription von Ndr2 und β -Aktin während dieser essentiellen Phase der Konsolidierung des Furchtgedächtnisses lässt daher vermuten, dass die Kinase in Signalwege involviert sein könnte, die eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts während

dieser Phase regulieren.

Zahlreiche Befunde der letzten Jahre haben bereits die besondere Bedeutung des Aktinzytoskeletts für die Gedächtnisbildung und für die ihr zugrunde liegenden synaptischen Plastizität im Gehirn belegt (Cingolani and Goda, 2008; Fukazawa et al., 2003; Krucker et al., 2000; Lin et al., 2005; Chen et al., 2004). Es wird vermutet, dass die aktivitätsabhängige Expression von Neurotransmitterrezeptoren in der Synapse sowie eine strukturelle Neu- bzw. Umbildung von Synapsen oder dendritischen Spines über eine Dynamik des Aktinzytoskeletts reguliert werden. Diese Vorgänge dienen dazu, kürzlich erworbene Informationen in ein Langzeitgedächtnis zu überführen – ein Prozess, der als Konsolidierung bezeichnet wird (McGaugh, 2000; Zhou et al., 2001; Honkura et al., 2008; Rumpel et al., 2005). In der Tat konnten Lamprecht et al. (2006) zeigen, dass in Spines eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts während der Phase der Informationsspeicherung stimuliert wird. So konnten sie beobachten, dass 30 Minuten nach einer tonabhängigen Furchtkonditionierung Profilin, ein die Polymerisierung von Aktinfilamenten stimulierendes Protein, in den Spines der Neurone der lateralen Amygdala angereichert vorlag. Wird hingegen die Aktinpolymerisierung in der lateralen Amygdala kurze Zeit vor bzw. nach einer Furchtkonditionierung durch Cytochalasin D inhibiert, führte dies zu einer Beeinträchtigung der Bildung eines tonabhängigen Furchtgedächtnisses (Mantzur et al., 2009). Die Bedeutung der Dynamik des Aktinzytoskeletts für die Gedächtnisbildung konnten auch Diana et al. (2007) beobachten. Eine intrazerebroventrikuläre Injektion des Proteins CNF1 (cytotoxic necrotizing factor 1), eines Toxins aus dem Bakterium *Escherichia coli*, führte zu einer Verstärkung der Furchtantwort nach einer kontextabhängigen Furchtkonditionierung sowie einer Verbesserung des räumlichen Lernens von Mäusen. CNF1 aktiviert die Rho-GTPasen RhoA und Rac1, die ihrerseits die Polymerisation von Aktinfilamenten induzieren.

All diese Studien zeigen, dass eine strukturelle Reorganisation des Aktinzytoskeletts essentiell für die Gedächtnisbildung ist, jedoch wurde bislang nur unzureichend untersucht, in welchem zeitlichen Bereich während der Konsolidierungsphase die Dynamik der Aktinfilamente in der Amygdala wichtig für die Bildung eines Furchtgedächtnisses ist. Darüber hinaus wurde bisher nur die Bedeutung der Aktinfilamentdynamik für die Konsolidierung, nicht aber für die Rekonsolidierung von Gedächtnisinhalten untersucht. Bei der Rekonsolidierung handelt es sich um eine Stabilisierung des Furchtgedächtnisses, welche durch den einmaligen unverstärkten Abruf der Gedächtnisinhalte ausgelöst wird. Dabei wird das zuvor konditionierte Gedächtnis vorübergehend in einen labilen Zustand überführt, was je nach den zum Zeitpunkt des Abrufs herrschenden Bedingungen auch eine Destabilisierung des Gedächtnisses zur Folge haben kann. Die Amygdala ist für die Rekonsolidierung konditionierter Furcht – ebenso wie für die Konsolidierung – von grundlegender Bedeutung (Nader and Hardt, 2009; Alberini, 2005; Tronson and Taylor, 2007). Daher stellt sich die Frage, ob die dynamische Reorganisation der Aktinfilamente ähnlich wie bei der Konsolidierung auch bei der Rekonsolidierung eines Furchtgedächtnisses eine Rolle spielt.

1.3 Das Zelladhäsionsmolekül Integrin

1.3.1 Die Funktion der Integrine in neuronalen Zellen

Als heterodimere Transmembranrezeptoren vermitteln die Integrine sowohl die Adhäsion der Zellen an die extrazelluläre Matrix (ECM) als auch Zell-Zell-Adhäsionen und Signalprozesse an der Zellmembran. Es sind 24 verschiedene Integrine bekannt, die sich über nichtkovalente Bindungen aus einer der 18 bekannten α -Untereinheiten sowie aus einem der 8 unterschiedlichen β -Untereinheiten zusammensetzen, wobei $\beta 1$ -Integrin in 12 Integrinen die beta-Untereinheit bildet (Hynes, 2002). Eine große Anzahl der Integrin-Untereinheiten wird im Gehirn von Säugetieren exprimiert (Pinkstaff et al., 1998; Pinkstaff et al., 1999; Schmid and Anton, 2003). Mit ihrer extrazellulären Domäne binden die Integrine an ihre Liganden, darunter unter anderem die in der extrazellulären Matrix vorkommenden Faserproteine Kollagen I bis IV, die löslichen Glykoproteine Fibronectin, Laminin und Tenascin, die Transmembranproteine der ADAM-Metalloproteasenfamilie aber auch an andere Zelladhäsionsmoleküle wie Cadherine oder Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie wie ICAM-1, VCAM-1 und L1 (Humphries et al., 2006; Felding-Habermann et al., 1997; Edwards et al., 2008). Durch ihre zytosolische Domäne sind die Integrine über Adapterproteine wie Talin, Vincullin und Paxillin eng mit dem Aktinzytoskelett verbunden. Darüber hinaus koppeln sie an Tyrosinkinasen wie FAK (focal adhesion kinase) und Src und vermitteln so intrazelluläre Signale, über die eine Reorganisation der Aktinfilamente während zellmorphologischer Prozesse reguliert wird (Harburger and Calderwood, 2009).

In der Entwicklung des Nervensystems üben die Integrine wichtige Funktionen in der Zellmigration und in der Differenzierung von Gliazellen und Neuronen aus (Clegg et al., 2003). So konnten Plantman et al. (2008) und Andrews et al. (2009) zeigen, dass die Integrinrezeptoren wie zum Beispiel $\alpha 3 \beta 1$ -Integrin oder $\alpha 9 \beta 1$ -Integrin über die Bindung der extrazellulären Matrixmoleküle Laminin oder Tenascin das Auswachsen von Axonen von dorsalen Wurzelganglionneuronen regulieren. Eine wichtige Funktion von Integrinen in der Ausbildung von dendritischen Feldern konnte durch Marrs et al. (2006) analysiert werden. Durch eine Inaktivierung von $\beta 1$ -Integrinen induzierten sie in der sich entwickelnden Retina eine Retraktion auswachsender Dendriten von Ganglienzellen. Darüber hinaus zeigten Moresco et al. (2005), dass die Verzweigung von Dendriten und Axonen kortikaler Primärneurone der Maus von einer Integrin-vermittelten Zell-Matrix-Adhäsion abhängig ist. Auch sind Integrine wesentlich an der Bildung und Reifung von Spines und Synapsen beteiligt (Nikonenko et al., 2003; Webb et al., 2007; Shi and Ethell, 2006).

Im adulten Gehirn tragen die Integrine indessen zur synaptischen Plastizität bei. Zu ihren Funktionen in diesem Rahmen zählen die Stabilisierung aktivitätsinduzierter Signaltransmissionen sowie die Regulation der synaptischen Erregbarkeit (Chavis and Westbrook, 2001; Chan et al., 2003; Huang et al., 2006; Cingolani et al., 2008). Die Arbeitsgruppe von Gary Lynch war die erste, die eine Rolle der Integrine in der synaptischen Plastizität untersuchte. Sie belegten mit ihrer Studie aus dem Jahr 1991, dass die Stabilisierung, nicht aber die Induktion einer Langzeitpotenzierung (LTP) im Hippokampus von der Aktivität von Integrinrezeptoren abhängig ist (Xiao et al., 1991). LTP ist eine durch zeitlich koordinierte Stimulation eines prä- und postsynaptischen Neurons hervorgerufene, lang anhaltende Verstärkung der synaptischen Übertragung zwischen diesen beiden Zellen. Aufgrund der Annahme, dass über eine Modifikation der synaptischen Signalübertragung

Lern- und Gedächtnisinhalte im Gehirn gespeichert werden, dient die LTP als Modellsystem für die Untersuchung von Lernprozessen und der Gedächtnisbildung (Bliss and Collingridge, 1993). Weitere Studien haben gezeigt, dass zum einen eine Aktivierung von Glutamatrezeptoren des AMPA-Typs (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) eine Erhöhung der Oberflächenexpression von $\alpha 5\beta 1$ -Integrinen induziert (Lin et al., 2005) und zum anderen $\beta 3$ -Integrine die Anzahl der AMPA-Rezeptoren in der Postsynapse regulieren (Cingolani et al., 2008). Außerdem gelang es Bernard-Trifilo et al. (2005) eine Phosphorylierung der Src-Kinase durch die Bindung von Fibronectin bzw. RGD-Peptiden an die für sie spezifischen Integrine nachzuweisen. Diese wiederum führte zu einer Phosphorylierung der Rezeptoruntereinheiten NR2B und NR2A, woraus eine Erhöhung der Anzahl funktionaler NMDA-Rezeptoren (N-Methyl-D-Aspartat) in der synaptischen Membran resultierte. Auf Basis zahlreicher Studien wird mittlerweile allgemein angenommen, dass die Plastizität der Synapsen der Gedächtnisbildung im zentralen Nervensystem zugrunde liegt. In der Tat konnte für die Integrine eine essentielle funktionelle Beteiligung an der Konsolidierung von Gedächtnisinhalten gezeigt werden. In heterozygoten Mäusen mit einem Defizit in der Expression von $\alpha 3$ -, $\alpha 5$ - und $\alpha 8$ -Integrin konnte zum einen eine Verminderung in der hippokampalen LTP und zum anderen eine Beeinträchtigung der hippokampusabhängigen räumlichen Gedächtnisbildung festgestellt werden. Hinweise für einen Einfluss auf eine ton- oder kontextabhängige, wobei letztere ebenfalls hippokampusabhängig ist, Furchtkonditionierung fanden sich dagegen nicht (Chan et al., 2003). Ein konditionell induzierter Verlust der Expression von $\alpha 3$ -, $\alpha 8$ - bzw. $\beta 1$ -Integrin in exzitatorischen Neuronen des postnatalen Vorderhirns von Mäusen verursachte ebenfalls eine Beeinträchtigung der NMDA-Rezeptor-abhängigen LTP im Hippokampus. Doch im Gegensatz zu $\alpha 8$ -defizienten Mäusen, die keine Beeinträchtigung in ihrer Gedächtnisbildung aufwiesen, zeigten $\alpha 3$ - bzw. $\beta 1$ -Integrin-defiziente Mäuse eine deutliche Schwächung in der Ausprägung eines Arbeitsgedächtnisses, nicht aber eines räumlichen Gedächtnisses (Chan et al., 2006; Chan et al., 2007; Chan et al., 2010). Diese Studien weisen darauf hin, dass die aus unterschiedlichen α - und β -Untereinheiten zusammengesetzten Integrindimere auch funktionell unterschiedlich an der Speicherung von Gedächtnisinhalten im Hippokampus beteiligt sind (McGeachie et al., 2011).

1.3.2 Die Aktivität der Integrine wird über bidirektionale sowie über Endozytose/Exozytose-Signalwege reguliert

Die Integrinrezeptoren agieren über zwei verschiedene Wege der Signaltransmission. Einerseits über extrazellulär gerichtete *inside-out*-Signalwege und andererseits über intrazellulär gerichtete *outside-in*-Signalwege. Die Integrin-vermittelte Zelladhäsion ist im Zusammenspiel dieser beiden Signalwege zu verstehen, die jedoch bislang fast ausschließlich in Zellen des Immunsystems untersucht wurden. Erste Studien belegen nun (siehe Abs. 1.3.1), dass die Aktivität der Integrine auch im zentralen Nervensystem über *inside-out*- und *outside-in*-Signalwege reguliert wird. Lin et al. (2005) fanden beispielsweise heraus, dass eine Stimulation von AMPA-Rezeptoren zu einer Erhöhung der Expression von $\alpha 5$ - und $\beta 1$ -Integrinen in der Plasmamembran führte. Weiterhin konnten Grabham und Goldberg (1997) eine durch den Nervenwachstumsfaktor NGF (engl. nerve growth factor) induzierte Akkumulation von $\beta 1$ -Integrinen in den Spitzen der Filopodien von axonalen Wachstumskegeln beobachten. Diese Studien sind Beispiele für Integrin-vermittelte *inside-out*-Signalwege, wohingegen die von Bernard-Trifilo et al. (2005) beobachtete Erhöhung funktionaler NMDA-Rezeptoren, als Folge einer Aktivierung von c-Src über eine Integrin-

ligandenbindung, ein Beispiel für einen *outside-in*-Signalweg darstellt.

Als Antwort auf spezifische externe Signale werden in Immunzellen darüber hinaus intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, welche die Bindung von Talin und Kindlin an die zytosolische Domäne der β -Untereinheit von Integrinen induzieren. Diese Interaktion wiederum löst einen Konformationswechsel der Rezeptoren aus und erhöht über eine *inside-out*-Aktivierung der Integrine deren Ligandenaffinität (Moser et al., 2009). Zusätzlich wird eine Aktin-vermittelte Aggregation der Rezeptoren in der Plasmamembran stimuliert, so dass dieser Integrin-vermittelte *inside-out*-Signalweg letztendlich die Zelladhäsion steigert (Abram and Lowell, 2009; Harburger and Calderwood, 2009). Eine Ligandenbindung an die extrazelluläre Domäne der Integrine induziert hingegen einen *outside-in*-Signalweg der Rezeptoren, in welchem durch eine Anlagerung von Adaptor- und Signalproteinen an die zytoplasmatische Domäne der Integrine Signalkaskaden aktiviert werden, die insbesondere die Organisation von Aktinfilamenten regulieren (Legate et al., 2009; Kim et al., 2003; Giancotti and Tarone, 2003). Ferner konnte beobachtet werden, dass eine Bindung von Kationen, wie Magnesium oder Manganionen an die α -Untereinheit zu einer Konformationsänderung der Integrine führt, die wiederum in einer erhöhten Affinität zu deren Liganden resultiert und so einen die Aktivierung verstärkenden Mechanismus der Rezeptoren darstellt (Gotwals et al., 1999). Integrine können somit bidirektional aktiviert werden, wobei die Integrin-vermittelten *inside-out*- und *outside-in*-Signalwege oft eng miteinander verknüpft sind und sich gegenseitig stimulieren (Shattil et al., 2010). Inwieweit die Funktion von Integrinen in neuronalen Zellen ebenfalls über diese oder auch ähnliche Signalwege reguliert wird ist hingegen weitgehend unerforscht.

Über die Bindung an extrazellulären Matrixliganden beeinflussen die Integrine das Wachstum, die Differenzierung und die Migration von Zellen. Dabei liegen die Zelladhäsionsmoleküle in auswachsenden Strukturen, wie zum Beispiel Wachstumskegel, in eingegrenzten Bereichen, den sogenannten fokalen Adhäsionskomplexen, akkumuliert vor und sind über Adapterproteine wie Paxilin und Talin eng mit dem Aktinzytoskelett verbunden. Aufgrund der ständigen Vorwärtsbewegung von Wachstumskegeln bzw. migrierenden Zellen unterliegen die Integrine einer ständigen Umverteilung in der Plasmamembran, welche durch die dynamische Reorganisation von Aktinfilamenten vermittelt wird (Renaudin et al., 1999; Huveneers and Danen, 2009). So beobachteten Grabham et al. (2000), dass in axonalen Wachstumskegeln sensorischer Neurone $\beta 1$ -Integrin in die Spitzen von Filopodien transportiert wird. Diese Umverteilung der Rezeptoren in der Plasmamembran von Wachstumskegeln wird über Endozytose/Exozytose-Signalwege reguliert, in denen die Rab-GTPasen eine essentielle Rolle spielen (Eva et al., 2010). Die Endozytose von Integrinen findet dabei sowohl über Clathrin-abhängige als auch über Clathrin-unabhängige Signalwege statt. Mithilfe von Adaptorproteinen wie Numb, AP2 und Dab2 wird Clathrin zu den Integrinen rekrutiert, so dass nun folgend die Abschnürung der Clathrin-umhüllten Plasmamembraneinstülpungen mittels der GTPase Dynamin induziert wird (Caswell and Norman, 2008). Für den Bereich der Caveolae konnte gezeigt werden, dass durch eine intrazelluläre Interaktion mit $\text{PKC}\alpha$ die Internalisierung von $\beta 1$ -Integrin über Dynamin vermittelt wird (Ng et al., 1999). Reguliert über die Aktivität der GTPase Rab5 sowie EEA1 (early endosome antigen 1) werden die internalisierten Vesikel zum frühen endosomalen Kompartiment transportiert, mit dem sie verschmelzen (siehe Abb. 1.5). In den frühen Endosomen erfolgt eine Sortierung der internalisierten Rezeptoren in einen lysosomalen Abbau- oder einen endosomalen Recyclingweg. Der Großteil der Integrine wird tatsächlich nicht degradiert, sondern über einen Rab4-abhängigen direkten Weg oder über ein peri-

nukleares Recycling-Endosom verlaufenden Rab11- bzw. Arf6-abhängigen indirekten Weg wieder zur Plasmamembran transportiert. Dort erfolgt durch Exozytose die erneute Integration der Integrine in die Membran (Pellinen and Ivaska, 2006; Caswell et al., 2009; Zerial and McBride, 2001). Im Hinblick auf morphologische Wachstumsprozesse im zentralen Nervensystem ermöglicht die Internalisierung und das Recycling der Integrine es neuronalen Zellen somit, die Adhäsion zur extrazellulären Matrix zu lösen um an einer anderen Stelle wieder an diese zu binden und so das Auswachsen von Neuriten zu koordinieren (Eva et al., 2010).

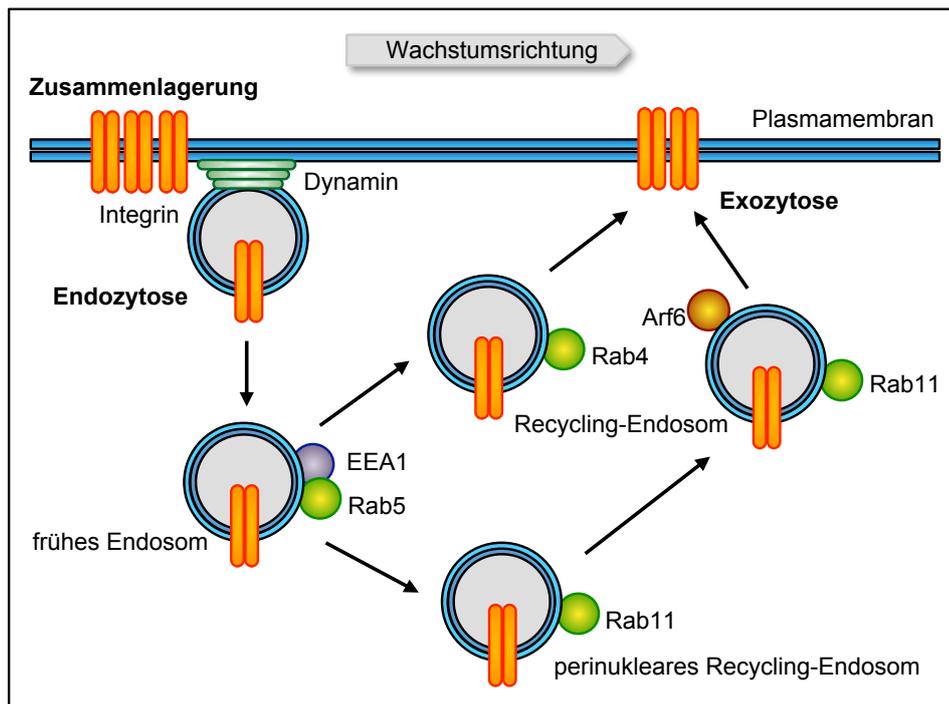


Abbildung 1.5: Modell des Integrin-Endozytose/Exozytose-Signalweges

Integrine lagern sich in fokalen Adhäsionskomplexen zusammen. Induziert beispielsweise durch die Vorwärtsbewegung eines dendritischen oder axonalen Wachstumskegels werden die Integrine durch eine Clathrin-abhängige bzw. Clathrin-unabhängige Endozytose internalisiert. Die Abschnürung der Vesikel wird dabei durch die GTPase Dynamin vermittelt. Reguliert über EEA1 und die GTPase Rab5 wandern die Vesikel zu einem frühen Endosom und verschmelzen mit diesem. Die Integrine werden anschließend über zwei Wege zurück zur Plasmamembran transportiert und recycelt. Der lange indirekte Weg verläuft über ein perinukleares Recycling-Endosom sowie einem Recycling-Endosom und wird über die Aktivität der GTPasen Rab11 bzw. Arf6 vermittelt. Über einen direkten Weg, der abhängig von Rab4 ist, werden die Integrine hingegen unmittelbar über ein Recycling-Endosom zur Membran transportiert wo nun durch Exozytose die Zelladhäsionsmoleküle erneut in die Plasmamembran integriert werden.

1.4 Zielstellungen

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Bedeutung von Ndr2 in der Differenzierung und Funktion von Neuronen des murinen ZNS.

Hierzu sollte zum einen der Einfluss von Ndr2 auf das Auswachsen und die Verzweigung von Dendriten untersucht und die hieran beteiligten zellulären Prozesse identifiziert werden. Aufbauend auf meinen Vorarbeiten an PC12-Zellen wurden diese Studien in transfizierten Kulturen hippocampaler Primärneuronen durchgeführt. So untersuchte ich mit pharmakologisch-zellbiologischen, immunzytochemischen und biochemischen Methoden, ob und wie Ndr2 während dieser neuronalen Differenzierungsprozesse mit Integrin-Signalwegen interagiert.

Zur Übertragung der so erhobenen zellulären Befunde in das Nervensystem *in vivo* sollte zum anderen ein konditionales Ndr2-transgenes Mausmodell generiert und charakterisiert werden. Mithilfe histochemischer Färbungen und einer quantitativen Analysemethode in Ndr2-transgenen Mäusen untersuchte ich hier, ob eine zu einem spät postnatalen Zeitpunkt induzierte Überexpression von Ndr2 in Regionen des Vorderhirns ebenfalls einen Einfluss auf das Auswachsen der Neuriten von exzitatorischen Neuronen *in vivo* hat.

Um darüber hinaus weitergehende Untersuchungen Ndr2-abhängiger Plastizitätsprozesse vorzubereiten, sollte parallel mit den oben genannten Arbeiten die Bedeutung der dynamischen Regulation von Aktinfilamenten für die Gedächtnisbildung in ihrem zeitlichen Verlauf grundsätzlich analysiert werden. Zu diesem Zweck bestimmte ich die Auswirkungen einer, durch die intraamygdaläre Injektion des Aktinfilamente-stabilisierenden Toxins Phalloidin, induzierten Blockade der Aktindynamik auf verschiedene Phasen der Konsolidierung und Rekonsolidierung eines Furchtgedächtnisses.

Kapitel 2

Materialien

2.1 Reagenzien, Lösungen und Medien

Reagenzien, Lösungen und Medien	Hersteller
Acrylamid 30 % (Acrylamid Bisacrylamid 37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Acrylamid 40 % (Acrylamid-Bisacrylamid 29:1)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ammoniumpersulfat	Carl Roth, Karlsruhe, D
β -D-Arabinofuranosyl)cytosin (AraC)	Sigma-Aldrich, München, D
B-27 (50 %)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Black-Gold II	Histo-Chem Inc., Jefferson, USA
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe, D
Bovine Serum Albumin Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe, D
Bromphenolblau	Serva Electrophoresis, Heidelberg, D
Chlorwasserstoffsäure (37 %)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Chromalaun	Carl Roth, Karlsruhe, D
Chromschwefelsäure	Sigma-Aldrich, München, D
Complete Proteinaseinhibitor	Roche, Mannheim, D
Destilliertes Wasser (steril)	Invitrogen, Karlsruhe, D
3,3'-Diaminobezidin	Sigma-Aldrich, München, D
Dithiothreitol (DTT)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, D
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck AG, Darmstadt, D
DMEM Medium	Invitrogen, Karlsruhe, D
DNase	Roche, Mannheim, D
D-Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe, D
Echistatin	Sigma-Aldrich, München, D
Eisessig/ Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, D
Entellan	Merck AG, Darmstadt, D
Ethanol (96 % und 100 %)	Carl Roth, Karlsruhe

Weiter auf nächster Seite

Reagenzien, Lösungen und Medien	Hersteller
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München, D
fötales Kälberserum Gold	PAA, Cölbe, D
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe, D
EGTA	Sigma-Aldrich, München, D
Gelatine Typ A (aus Schweinehaut)	Sigma-Aldrich, München, D
Geneticin	Invitrogen, Karlsruhe, D
D-Glukose	Sigma-Aldrich, München, D
Glutaraldehyd (25 %)	Sigma-Aldrich, München, D
Glycerol/ Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe, D
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, D
Gummi Arabicum	Sigma-Aldrich, München, D
HBSS (Mg ²⁺ - und Ca ²⁺ -frei)	Invitrogen, Karlsruhe, D
HBSS (mit Mg ²⁺ und Ca ²⁺)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Heparin-Natriumsulfat (25000 IE)	Braun Melsungen AG, Melsungen, D
HEPES	Sigma-Aldrich, München, D
Hydrochinon	Sigma-Aldrich, München, D
Immu-Mount	Thermo Scientific, Pittsburg PA, USA
Isofluran	Baxter GmbH, Unterschleißheim
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, D
Kaliumacetat	Carl Roth, Karlsruhe, D
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, München, D
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck AG, Darmstadt, D
Kallocryl AK	Speiko, Dr. Speier GmbH, Münster, D
Kalziumchlorid	Sigma-Aldrich, München, D
Ketanest S	Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe, D
Kollagen IV	Sigma-Aldrich, München, D
Kresylviollet	Sigma-Aldrich, München, D
LB-Agar	Sigma-Aldrich, München, D
LB-Broth	Sigma-Aldrich, München, D
L-GlutaMAX-I	Invitrogen, Karlsruhe, D
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe, D
Magnesiumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, D
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich, München, D
Manganchlorid	Sigma-Aldrich, München, D
β -Mercapthoethanol	Serva Electrophoresis, Heidelberg, D
MES	Carl Roth, Karlsruhe, D
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, D
2-Methylbutan	Sigma-Aldrich, München, D
Methylenblau	Sigma-Aldrich, München, D
Milchpulver (Blotting grade)	Carl Roth, Karlsruhe
MOPS	Sigma-Aldrich, München, D
Mowiol 4-88	Sigma-Aldrich, München, D

Weiter auf nächster Seite

Reagenzien, Lösungen und Medien	Hersteller
TEMED	Serva Electrophoresis, Heidelberg, D
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, München, D
Natriumazid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumcitrat	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, München, D
Natriumdihydrogenphosphat	Merck AG, Darmstadt, D
Natriumdodecylsulfat als Pelett (SDS)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, D
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich, München, D
Natriumhydroxid (Pelletiert)	Merck AG, Darmstadt, D
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich, München, D
Neurobasal Medium	Invitrogen, Karlsruhe, D
NGF 2.5 S	Invitrogen, Karlsruhe, D
Nonidet-40	Serva Electrophoresis, Heidelberg, D
Obtustatin	Pineda, Berlin, D
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe, D
pegGold Universal Agarose	PegLab, Erlangen, D
Pentobarbital	Sigma-Aldrich, München, D
PLL-Lösung (0,1 %)	Sigma-Aldrich, München, D
PDL-bromid	Sigma-Aldrich, München, D
Penicillin/Streptomycin (100 x)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin (100 x)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Pferdeserum	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, D
Phalloidin-Rhodamin	Invitrogen, Karlsruhe, D
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, München, D
Ponceau S	Carl Roth, Karlsruhe, D
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare, München, D
Retacillin compositum 0,6 Mio I.E.	Jenapharm, Jena, D
Rompun	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, D
RPMI-1640	Invitrogen, Karlsruhe, D
Silbernitrat	Carl Roth, Karlsruhe, D
Triethanolamin	Carl Roth, Karlsruhe, D
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck AG, Darmstadt, D
Triton-X (100 %)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, D
Tris	Carl Roth, Karlsruhe, D
Tris-HCL	Carl Roth, Karlsruhe, D
Phalloidin-Rhodamin	Invitrogen, Karlsruhe, D
TrueBlot anti-rabbit-Ig IP Beads	eBioscience, San Diego, USA
TrueBlot anti-rabbit-Ig Antikörper	eBioscience, San Diego, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich, München, D
Tryptone	Sigma-Aldrich, München, D

Weiter auf nächster Seite

Reagenzien, Lösungen und Medien	Hersteller
Trypsin (2,5 %)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Tween 20	Serva Electrophoresis, Heidelberg, D
Wasserstoffperoxid (30 %)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Yeast-Extract	Sigma-Aldrich, München, D
Zinkphosphat-Cement	Hoffman Dental Manufaktur GmbH, Berlin, D
Zitronesäure	Carl Roth, Karlsruhe, D

2.2 Kits

Kit	Hersteller
DC Protein Assay	BioRad, München, D
ECL Plus Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, München, D
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden, D
Taq-DNA-Polymerase Kit	Qiagen, Hilden, D
Vectastain Elite ABC Kit	Vector Laboratories, Inc., Bulingame, CA USA

2.3 DNA-Standards

DNA-Standard	Herstller
Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Gene Ruler 1 kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, D

2.4 Protein-Standards

Protein-Standard	Herstller
Paige Ruler Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Precision Plus Protein Standards Dual Color	Bio-Rad, Hercules CA, USA

2.5 Bakterienstamm

Bakterienstamm	Hersteller
<i>Escherichia coli</i> DH5 α Genotyp: F ['] /endA1 hsdR17(rk-, mk+) suPE44 thi-1 recAI gyrA, (Nal ^r) relA1 D(lacZYA-argF)U169 deoR (φ 80lacZ Δ M15)	Invitrogen, Karlsruhe, D

2.6 Zelllinien

Zelllinie	Hersteller
PC12	DSMZ GmbH, Braunschweig, D
293T	DSMZ GmbH, Braunschweig, D

2.7 Mausstämme

Mausstamm	Hersteller
C57 BL/6JBomTac	M&B Taconic, Berlin, D
B6.Cg-Tg(<i>Camk2a-cre</i>) 159Cgn/Arte Ndr2 ^{lox/tg55}	Artemis, Köln, D Labor Prof. Dr. Oliver Stork, Generierung mit Hilfe der Firma Polygene, Rümlang, CH
Ndr2 ^{lox/tg68}	Labor Prof. Dr. Oliver Stork, Generierung mit Hilfe der Firma Polygene, Rümlang, CH
Ndr2 ^{lox/tg89}	Labor Prof. Dr. Oliver Stork, Generierung mit Hilfe der Firma Polygene, Rümlang, CH

2.8 Primärantikörper

Tabelle 2.1

Antigen	Wirt	Firma	WB	ICC/IHC
Aktin (pan)	Kaninchen	Abcam	1:2000	—
Dynamin	Maus	BD Biosciences	1:1000	1:500
Gap-43	Kaninchen	Chemicon	—	1:500
GFP	Ziege	Abcam	1:1000	1:500/1:2000
β 1-Integrin (Phospho T788+T789)	Kaninchen	Abcam	—	1:200
β 1-Integrin	Hamster	BioLegend	—	1:500
Map2 a und b	Maus	Abcam	—	1:1000
Ndr2	Kaninchen	Pineda	1:1000	1:200
PSD95	Maus	Synaptic Systems	—	1:500
Rab5	Maus	Synaptic Systems	1:1000	1:200
Rab11	Kaninchen	Sigma-Aldrich	1:1000	—
Rab11	Maus	BD Biosciences	1:1000	1:100
Synaptophysin	Meerschweinchen	Synaptic Systems	—	1:500

2.9 Sekundärantikörper

Antigen	Wirt	Firma	Konjugat	WB	ICC/IHC
Maus	Schaf	GE Healthcare	HRP	1:10.000	—
Kaninchen	Ziege	Dako	HRP	1:5000	—
Ziege	Kaninchen	Dako	HRP	1:5000	—
Kaninchen-IgG	keine Angaben	eBioscience	HRP	1:1000	—
Ziege	Esel	Invitrogen	Alexa 488	—	1:1000
Maus	Esel	Invitrogen	Alexa 488	—	1:1000
Kaninchen	Esel	Invitrogen	Alexa 488	—	1:1000
Meerschweinchen	Ziege	Invitrogen	Alexa 488	—	1:1000
Maus	Esel	Invitrogen	Alexa 555	—	1:1000
Kaninchen	Esel	Invitrogen	Alexa 555	—	1:1000
Meerschweinchen	Ziege	Invitrogen	Alexa 546	—	1:1000
Hamster	Ziege	Invitrogen	Alexa 555	—	1:1000
Maus	Esel	Invitrogen	Alexa 647	—	1:1000
Kaninchen	Esel	Invitrogen	Alexa 547	—	1:1000

2.10 Materialien

Material	Hersteller
Deckgläschen (Ø 12 mm)	VWR GmbH, Darmstadt, D
Deckgläschen (12 mm x 24 mm)	Kindler, Freiburg, D
Deckgläschen (24 mm x 50 mm)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Eppendorf-Reagensgefäß (0,5, 1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Filterpapier	Carl Roth, Karlsruhe, D
Hamilton-Spritzen (2 µl und 10 µl)	Hamilton, Bonaduz, CH
Immubilon PVDF-Membran	Millipore, Schwalbach, D
Kanülen (21 G, 22G, 23 G 25 G, 26 G)	Terumo, Leuven, Belgien
Kulturschalen (Ø 35 mm, 100 mm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Kulturflaschen mit Siebdeckel (25 und 75 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Microfuge Tube	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, D
Multiwell-Platten (24, 12 und 6 Well)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Pasteurpipetten	Carl Roth, Karlsruhe, D
Pipettenspitzen (gestopft und ungestopft)	Brand GmbH, Wertheim, D
Präparierbesteck (Pinzetten, Scheren)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, D
Ringpinzette	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, D
Schrauben (0-80X3/32)	Plastics one, Roanoke, USA
Superfrost Objektträger	Carl Roth, Karlsruhe, D
Spritzen (2 ml)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Sterilfilter (0,2 µm)	Whatman GmbH, Dassel, D
Ultrazentrifugenröhrchen (5 ml)	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, D
Zellschaber	PAA, Cölbe, D
Zentrifugationsröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D

2.11 Software

Software	Hersteller
Adobe Photoshop CX3 Extended 10.0.1	Adobe Systems Inc., San Jose CA, USA
ANY-Maze Videotracking System V 4.50	Stoelting, Wood Dale IL, USA
AxioVision V 4.0	Zeiss, Jena, D
AxioVision V 4.63 SP1	Zeiss, Jena, D
EndNote X2	Thomson ResearchSoft, Carlsbad, USA
FileMaker Pro 9.0	FileMaker Inc., Unterschleißheim, D
Image J 1.42q	National Institutes of Health, Bethesda MD, USA
Image Reader LAS-1000 Pro V 2.61	Fuji Photo Film Co., LTD, Tokio, JPN
LAS AF V 2.2.0 build 4758	Leica Microsystems, Wetzlar, D
LSM 510 V 3.2	Zeiss, Jena, D
Office 2000	Microsoft, Redmond WA, USA
Office 2008	Microsoft, Redmond WA, USA
PASW Statistics V 17.0.2	SPSS Inc., Chicago IL, USA
QWin V 3.5	Leica Microsystems, Wetzlar, D
TSE Fear Conditioning Software V 08.03	TSE Systems, Bad Homburg, D

Kapitel 3

Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Primäre hippocampale Neuronenkultur kokultiviert mit einem Astroglia- rasen

Die in vielen Studien verwendete hippocampale Primärkultur wird aus 18 Tage altem embryonalem Gewebe der Maus oder der Ratte gewonnen. Zu diesem Entwicklungszeitpunkt ist die Bildung pyramidaler Projektionsneurone, welche E 15 beginnt, im Wesentlichen abgeschlossen. Die Generierung von Körnerzellen, welche im Gyrus Dentatus vorkommen, sowie von Interneuronen hat erst moderat begonnen und findet zum größten Teil postnatal statt. Die Zahl der Gliazellen ist ebenfalls zu diesem Entwicklungszeitpunkt sehr gering (Schlessinger et al., 1978). Der Vorteil einer Neuronenkultur aus einem 18 Tage alten murinen Hippokampus besteht somit darin, dass man von einer fast rein aus exzitatorischen Pyramidenzellen bestehenden Kultur ausgehen kann, in der die Zellen einen vergleichbaren morphologischen und physiologischen Phänotypen aufweisen. Durch das fast vollständige Fehlen von inhibitorischen Interneuronen bilden die Neurone lange axonale Projektionen, stark verzweigte Dendriten sowie viele Spines und synaptische Verbindungen aus.

Die Gewinnung der für diese Arbeit verwendeten Primärkulturen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Banker und Goslin (1998). Hippokampale Neurone von 18 Tage alten Mäuseembryonen wurden in Anwesenheit eines ca. zwei Wochen alten, fast ausschließlich aus Astrogliazellen Typ 1 bestehenden, Gliarasen kultiviert, um ein langfristiges Überleben der Zellen zu sichern. Für diese Art der Zellkultivierung wurden zunächst auf dem Boden einer im Durchmesser 30 mm großen Kulturschale Gliazellen ausplattiert. Diese wuchsen zu einem, sich über die ganze Fläche ausgebreiteten, Einzellrasen heran. Hippokampale Neurone wurden zunächst auf PDL beschichtete Deckgläschen ausplattiert und nach dessen vollständiger Anheftung auf den Gliarasen platziert. In dem von den Gliazellen konditionierten Mediums konnten sich nun die Neurone ausdifferenzieren.

3.1.1.1 Gliakultur einschließlich der Herstellung konditioniertem Mediums

Für die Gewinnung von Astrogliazellen Typ 1 wurden neugeborene C57 BL/6JBomTac Mäuse im Alter von P 0 bis P 3 unter einer Präparierbank (Typ KH-115, Kojair, Vilppula, FIN) dekaptiert, das Gehirn heraus präpariert und in 37 °C warmes, Kalzium-

und Magnesium-freies HBSS überführt. Unter einem Stereomikroskop (Typ S6D, Leica-Mikrosysteme, Wetzlar, D) wurden die zerebralen Hirnhälften einschließlich dem Hippokampus isoliert und die Hirnhäute (Meningen) mit einer Pinzette abgezogen. Um eine Verunreinigung mit Endothelzellen und Fibroblasten zu vermeiden, war eine vollständige Entfernung der Meningen, bestehend aus Dura mater, Achrinoidea mater sowie der Pia mater, bei diesem Schritt essentiell. Anschließend wurden die Gewebestücke mit einer Schere zerkleinert und mithilfe einer Pasteurpipette in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Unter einer Sterilbank (Typ BW-130 silver, Kojair, FIN) wurden diese, um letzte Hirnhautreste zu entfernen, dreimal mit warmem HBSS gewaschen. Für ein möglichst vollständiges Dissoziieren in Einzellzellen wurden die Gewebestücke mit 0,25 % Trypsin in einem Endvolumen von 5 ml in HBSS für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch dreimaliges Waschen mit HBSS abgestoppt. Nach einer Zugabe des Enzyms DNase mit einer Endkonzentration von 0,1 % in 2 ml HBSS, erfolgte nun unter Verwendung zweier unterschiedlich großer Kanülen (G 21 und G 25) die mechanische Dissoziation des mit Trypsin anverdauten Gewebes. Während dieses Vorganges diente die Inkubation mit der DNase dazu, die aus nekrotischen Zellen austretende DNA abzubauen und somit ein erneutes Verklumpen der Zellen zu verhindern. Anschließend wurde die Zellsuspension durch ein Netz mit einer Porengröße von 125 μm gefiltert und auf ein Volumen von 10 ml mit Gliamedium (siehe Tab. 3.1) aufgefüllt.

Tabelle 3.1: Zusammensetzung der verwendeten Medien

Neuronenmedium	Gliamedium
Neurobasal Medium	DMEM Medium
2 % B-27 (v/v)	10 % FBS (v/v)
100 U/ml Penicillin	100 U/ml Penicillin
100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin
0,5 mM L-GlutaMAX-I	2 mM L-Glutamin

Mit einer Neubauer-Zählkammer wurde nun die Zelldichte lebender Zellen bestimmt, wobei durch Zugabe von Trypanblau (4 %) tote Zellen, welche durch das Eindringen des Farbstoffes in die Zelle angefärbt wurden, ausgeschlossen werden konnten. Für die Gewinnung von Gliakulturen wurden Zellen mit einer Dichte von 30.000 Zellen/ cm^2 in einem Volumen von 2 ml Gliamedium in eine Kulturschale (\varnothing 30 mm) ausplattiert. Fast ausschließlich Astrogliazellen Typ 1 sind in der Lage, sich in serumhaltigem Medium an den Boden der Kulturschale anzuheften und dort auszuwachsen. Mit einem Mediumwechsel am darauffolgenden Tag wurden alle Zellen entfernt, die sich nicht angeheftet hatten. Die Gliakulturen wuchsen innerhalb von ca. 14 Tagen bei 5 % CO_2 Gehalt, 95 % Luftfeuchtigkeit, einer Temperatur von 37 °C und zweimaligen Mediumwechsel pro Woche zu einem Einzellrasen heran, welcher die ganze Schale bedeckte. Für ihre Subkultivierung mit hippokampalen Primärneuronen wurde das Medium einen Tag zuvor mit Neuronenmedium (siehe Tab. 3.1) ausgetauscht, so dass dieses von den Gliazellen unter anderem mit Wachstumsfaktoren etc. konditioniert werden konnte. Das Neuronenmedium ist speziell an die Bedürfnisse von hippokampalen Nervenzellen angepasst und inhibiert das Gliawachstum.

Für eine Gewinnung konditioniertem Mediums für die Kalziumphosphat-Transfektion von Neuronen, wurde das aus drei bis vier Embryonen gewonnene Zellmaterial in eine 75 cm^2 Kulturflasche mit 10 ml Gliamedium ausplattiert. Nach ca. 14 Tagen hatte sich ein lü-

ckenloser Gliarassen auf den Flaschenboden ausgebildet. Nun wurde das Gliamedium mit 10 ml Neuronenmedium ausgetauscht und für 24 h von den Gliazellen konditioniert. Zur Aufbewahrung wurde das Medium anschließend bei -20°C eingefroren. Die Gliakultur wurde für 3-4 Konditionierungen genutzt, bevor diese verworfen wurde.

3.1.1.2 Hippokampale Primärneuronenkultur

Einen Tag vor der Neuronenpräparation wurden die Deckgläschen mit PDL beschichtet. Zur Sterilisation wurden diese zuvor für 16 h bei 180°C gebacken. In eine Kulturschale (\varnothing 30 mm) wurden jeweils vier Deckgläschen gelegt und über Nacht bei Raumtemperatur mit einem Milliliter 0,1 mg/ml PDL beschichtet, welches zuvor in 0,15 M Boratpuffer pH 8,4 gelöst und steril filtriert wurde. Am darauffolgenden Tag wurden die Deckgläschen dreimal für eine halbe Stunde mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend in 2 ml Gliamedium (siehe Tab. 3.1) im Inkubator aufbewahrt. Nun wurde eine trächtige C57BL/6JBomTac Maus am Embryonaltag 18 (E0 = Tag der Befruchtung) mit Isofluran narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet. Durch Öffnen der Bauchhöhle wurden beide Hörner des Uterus herausoperiert, in eine Kulturschale (\varnothing 100 mm) überführt und unter einer Präparierbank die Embryonen aus der Gebärmutter und der Fruchtblase herauspräpariert. Es folgte nun unter einem Stereomikroskop die Dekapitierung und das Isolieren der Gehirne in warmem HBSS, welches Kalzium- und Magnesium-frei war, um die neuronale Aktivität zu reduzieren. Nach Entfernen der Hirnhäute wurde der Hippokampus nun mithilfe zweier Pinzetten herauspräpariert. Dabei ermöglichte eine sagittale Sicht auf die Hemisphäre, den Hippokampus dorsal über die Fissura hippocampi gut von dem Kortex abzugrenzen. Nach ventral konnte man ebenfalls dessen Begrenzung über die sich entwickelnde Fimbria hippocampus erkennen Banker und Goslin (1998). Nachdem alle Hippokampi gewonnen und diese unter einer Sterilbank (BW-130 silver, Kojair) mit 37°C warmem HBSS gewaschen wurden, konnten diese anschließend mit 0,25 % Trypsin in 2 ml HBSS für 15 min bei 37°C inkubiert werden. Die Enzymreaktion wurde durch dreimaliges Waschen mit HBSS für jeweils fünf Minuten gestoppt. Am Ende des letzten Waschschrittes wurde, wie schon zuvor für die Gewinnung der Gliazellen beschrieben, das Gewebe mit DNase (0,1 %) inkubiert und mit zwei unterschiedlich großen Kanülen (G 21 und G 25) in einem Volumen von 2 ml HBSS mechanisch dissoziiert, anschließend filtriert ($125\ \mu\text{m}$ Porengröße), in 5 ml Gliamedium aufgenommen und die Zellzahl lebender Zellen (Tote Zellen wurden ebenfalls mit einer 4 % Trypanblaulösung angefärbt) mit einer Neubauerzählkammer bestimmt. Je nach experimenteller Verwendung wurden die Zellen entweder mit einer Dichte von 60.000-80.000 Zellen/ cm^2 (Hohe Dichte, für Transfektionen) oder mit einer Dichte von 10.000-20.000 Zellen/ cm^2 (Geringe Dichte, Immunzytochemie) in 2 ml Gliamedium auf PDL-beschichtete Deckgläschen ausplattiert. Da Neurone zur Anheftung an das stark positiv geladene PDL serumhaltiges Medium benötigen, wurden die Zellen zunächst in Gliamedium inkubiert. Nach ca. 3-4 h hatten sich alle vitalen Zellen angeheftet, so dass die Deckgläschen nun in die Kulturschalen, vorliegend mit einem Gliarassen sowie für 24 h konditioniertem Neuronenmedium (siehe Tab. 3.1), überführt werden konnten. Nach zwei Tagen (DIV2) wurde die Kulturen mit einer hohen Neuronen Dichte mit $3\ \mu\text{M}$ AraC behandelt, um das Wachstum der Gliazellen zu hemmen. AraC ist ein Mitosehemmer, welcher sich in die DNA teilender Zellen einbaut und so diese abtötet. Ein Viertel des Mediums wurde jeweils in Abständen von sieben Tagen mit frischem konditioniertem Medium ausgetauscht. Die Neuronenkulturen wurden an unterschiedlichen Zeitpunkten ihrer Entwicklung (DIV7, 14 oder 21) fixiert.

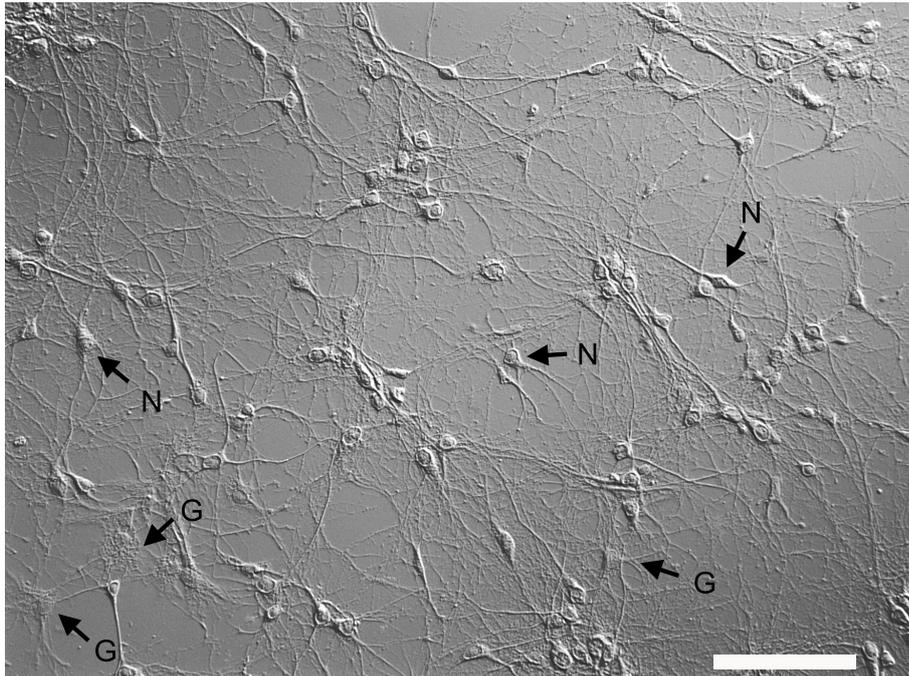


Abbildung 3.1: Interferenzkontrastaufnahme einer hippocampalen Primärkultur (DIV7)

Zu sehen ist eine typische Primärkultur mit einer hohen Dichte an Neuronen (N), diese gut an ihren abgerundeten Somata und den vielen von diesen abgehenden Neuriten zu erkennen sind. Des Weiteren weist die Kultur einige Astrogliazellen (G) auf. Mit ihrer sehr abgeflachten Struktur sind sie morphologisch gut von den Neuronen zu unterscheiden. Maßstab: 100 µm

3.1.1.3 Untersuchung der Dendritenverzweigung hippocampaler Primärneurone mittels Sholl-Analyse

3.1.1.4 Transfektion hippocampaler Primärneurone

Die Methode der DNA/Kalziumphosphat-Kopräzipitation ist eine sehr einfache, schnelle und auch kostengünstige Methode um Neurone in Kultur (*in vitro*) zu transfizieren. Sie wurde von Graham und Van der Eb (1973) entwickelt und beruht auf der Eigenschaft, dass Kalziumphosphat bei einem bestimmten pH-Wert als feine Präzipitate ausfällt. Diese sind unter einem Mikroskop schon bei einer geringen Vergrößerung als schwarze Körner zu erkennen. Mischt man nun DNA mit einer Kalziumchloridlösung und gibt eine phosphathaltige Lösung dazu, fällt die DNA, welche ebenfalls Phosphatgruppen enthält, mit dem Kalziumphosphat aus und wird als Präzipitat durch Endocytose in die Zelle aufgenommen. Für diese Arbeit wurden hippocampale Primärneurone an DIV3 nach einem abgewandelten Protokoll von Köhrmann et al. (1999) transfiziert. Hierfür wurden die mit Neuronen bedeckten Deckgläschen (Dichte: 60.000-80.000 Zellen/cm²) in eine neue Kulturschale mit 2 ml konditioniertem Neuronenmedium überführt und für ca. eine halbe Stunde erneut in den Inkubator (C200, Labotect Labor-Technik-Göttingen GmbH, Göttingen, D) gestellt. Die Gesamtmenge an DNA, welche für die Transfektion eingesetzt wurde, richtete sich nach der Anzahl der zu transfizierenden Plasmide, d.h. 1 Plasmid = 3 µg pro Schale, 2 Plasmide = 5 µg pro Schale, 3 Plasmide = 6 µg pro Schale, wobei immer die gleiche Menge

von jedem Plasmid eingesetzt wurde. Nach kurzem Abzentrifugieren der Plasmidlösung (Tischzentrifuge 5430, Eppendorf, Hamburg, D) wurde die entsprechende Menge an DNA in 60 μ l Kalziumchlorid (250 mM) überführt und durch auf- und abpipettieren gemischt. Anschließend folgte die Zugabe von 60 μ l 2 x HBS Puffer (siehe Tab. 3.2) zu dem Ansatz und ein erneutes Mischen.

Tabelle 3.2: Zusammensetzung des verwendeten Puffers

2 x HBS-Puffer
280 mM Natriumchlorid
50 mM HEPES
1,5 mM Dinatriumhydrogenphosphat

Der Ansatz wurde tropfenweise auf die Zellen gegeben, wobei dieser nicht länger als 2 min bei Raumtemperatur inkubieren durfte. Nach ca. 15 min wurde zum ersten Mal, die Größe der sich bildenden Präzipitate überprüft. Erreichten diese eine bestimmte Größe, was in der Regel nach einer bis anderthalb Stunden der Fall war, wurde die Reaktion durch zweimaliges Waschen mit 37 °C warmen HBSS (Mg^{2+} und Ca^{2+} frei) abgestoppt. Denn bildeten sich zu große Kalziumphosphat-Präzipitate aus, wirkten diese toxisch auf die Neurone. Anschließend wurden die Deckgläschen mit den Neuronen wieder in die Gliakulturschale überführt und zum Zeitpunkt DIV7 fixiert.

Tabelle 3.3: Für Transfektionen verwendete Plasmide

Plasmid	Herkunft
pEGFP-C1	Clontech
pEGFP-C1 Ndr2 (mus musculus)	Labor Prof. Dr. Oliver Stork
pDsRed1-N1	Clontech
pmCherry-C1	Labor Dr. Thomas Ulrich
pmCherry-C1 Ndr2 (mus musculus)	Eigene Klonierung
pECFP-C1-SARA-FYVE (homo sapiens)	Labor Dr. Stefanie Kliche
pLL3.7-EGFP-shNdr2-215 (mus musculus)	Labor Prof. Dr. Oliver Stork
pLL.3.7-EGFP-shLuc (firefly luciferase)	Labor Prof. Dr. Oliver Stork

3.1.1.5 Inhibierung der über β 1– bzw. β 3-Integrine vermittelten Zelladhäsion mit dem Disintegrin Echistatin

Das Polypeptid Echistatin wurde im Gift der Sandrassel-Otter (*Echis carinatus*) gefunden und isoliert. Es gehört zu den Disintegrinen und bindet mit dessen Peptidsequenz RGD (Arg Gly Asp) an die Integrinuntereinheiten β 1 und β 3. Echistatin verhindert durch diese Blockierung der Ligandenbindungsstellen eine Integrin-vermittelte Zell-Matrix-Adhäsion, da mögliche Liganden wie Laminin, Fibronectin und Kollagene nicht mehr an die Zelladhäsionsmoleküle binden können (Gould et al., 1990). Aus vorhergehenden Studien mit PC12-Zellkulturen zeigte sich eine effiziente Blockierung der β -Integrinuntereinheiten mit einer Endkonzentration von 200 nM Echistatin. Die Neuronenkulturen wurden somit 24 h nach der Transfektion mit der oben genannten Konzentration von Echistatin inkubiert. An DIV7 wurden die Kulturen fixiert um den Einfluss der Blockierung der Integrinliganden-

bindung auf das Ndr2-vermittelte Dendritenwachstum mithilfe der Scholl-Analyse zu untersuchen.

3.1.1.6 PFA-Fixierung hippokampaler Primärneurone

Hippokampale Primärneurone wurden zuerst kurz mit warmen PBS gewaschen und anschließend mit einer 37 °C warmen PFA-Fixierlösung (siehe Tab. 3.4) 15 min lang fixiert. Zum Schutz der fragilen Neuriten enthielt die Lösung Saccharose. Nach der Fixierung wurden die Zellen dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen auf einen Objektträger mit Immu-Mount fixiert und bis zur mikroskopischen Auswertung lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

Tabelle 3.4: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen

0,1 M PBS pH 7,4 (autoklaviert)	PFA-Fixierlösung
10 mM Dinatriumhydrogenphosphat	4 % PFA (w/v)
1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat	4 % D-Saccharose (w/v)
140 mM Natriumchlorid	0,1 M PBS
7 mM Kaliumchlorid	

3.1.1.7 Sholl-Analyse des Neuritenwachstums transfizierter hippokampaler Primärneurone

Für diese Arbeit wurde eine abgewandelte Form der erstmals von Sholl (1953) beschriebenen Methode zur Ermittlung des Wachstums und der Verzweigung von Dendriten verwendet. Für die Analyse werden konzentrischen Kreise ausgehend vom Mittelpunkt des Somas und einem definiertem Abstand zueinander um die Zelle gelegt. Die sich daraus ergebene Schnittpunkte der Dendriten mit diesen Kreisen geben Aufschluss über deren Verzweigung und Länge.

Transfizierte Primärneurone wurden zum Zeitpunkt DIV7 fixiert und an Hand des Fluoreszenzsignals von EGFP mithilfe des DMI 6000 Mikroskops (Leica-Mikrosysteme, Wetzlar, D) und der QWin Software als ein Mosaik aus 3 x 3 Bildern aufgenommen. Die neun Einzelbilder wurden anschließend automatisch zu einem Bild zusammengesetzt und eventuell aufgetretene Fehlüberlappungen manuell korrigiert. Nun konnte mithilfe der Software das Soma der Zelle markiert und automatisch der Mittelpunkt dessen bestimmt werden. Ausgehend von diesem, wurden nun von der QWin Software konzentrische Kreise im Abstand von jeweils 10 μm jeweils um das Zellsoma gelegt und die Schnittpunkte, welche mit den Dendriten der Zelle und jedem Kreis entstanden, von dieser ermittelt (siehe Abb. 3.2). Ausgegeben in einer Excelmatrix konnten nun die Daten bearbeitet und statistisch analysiert werden.

3.1.1.8 Statistische Analyse

Die einzelnen Versuche wurden in drei voneinander unabhängigen Messwiederholungen durchgeführt. Mithilfe der Software PASW Statistics erfolgte die statistische Auswertung der gewonnenen Daten mittels einer Varianzanalyse für wiederholte Messungen (repeated

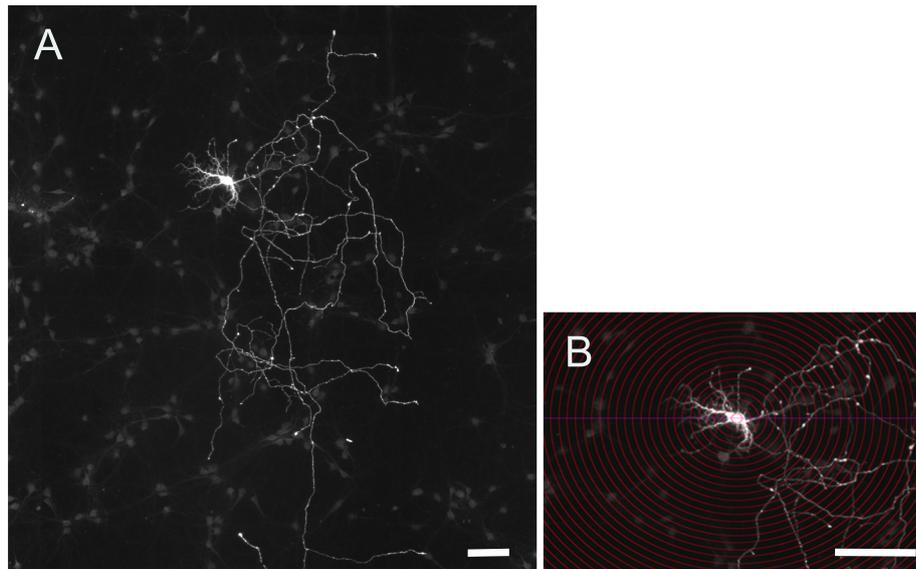


Abbildung 3.2: Sholl-Analyse eines EGFP-transfizierten Neurons **A** EGFP-transfiziertes Neuron, welches mit dem Leica DMI 6000 Epifluoreszenz Mikroskop und der QWin Software aufgenommen wurde. **B** Für eine Sholl-Analyse der Dendritenverzweigung wurden ausgehend von dem Mittelpunkt des Somas der EGFP-transfizierten Zelle konzentrische Kreise mit einem Abstand von $10\ \mu\text{m}$ gelegt, so dass mithilfe der QWin-Software die Schnittpunkte der Neuriten mit den jeweiligen Kreisen ermitteln werden konnte. Maßstab: A & B $100\ \mu\text{m}$

measures analysis of variance (RANOVA)). Dabei dienten die unterschiedlichen Transfektionsansätze (Transfektion) und die Behandlung mit Echistatin (Behandlung) als Inner-subjektffaktoren. Als Zwischensubjektffaktoren wurden die jeweiligen Abstände der Ringe zum Zellsoma definiert. Wurden dabei signifikante Haupteffekte ($p < 0,05$) beobachtet, konnte anschließend ein *Post-Hoc*-Test nach Fischer's Protected Least Significant Difference (PLSD) durchgeführt. Die Darstellung der Daten für jeden Punkt erfolgt als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (MW \pm SFM).

3.1.2 Zelllinien

3.1.2.1 293T-Zellen

Der Ursprung der humanen embryonalen Nierenzelllinie 293, welche auch oft mit der ungenauen Bezeichnung HEK-Zelllinie (engl. für human embryonal kidney) zitiert wird, liegt in den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts wo Graham und Kollegen (1977) aus einem humanen Fetus Nierenzellen entnahmen und diese mit geschnittenen Fragmenten des humanen Adenovirus 5 transfizierten. Die embryonalen Zellen zeigten nach dem Einbau der Virus-DNA eine hohe Proliferationsrate ähnlich derer von Krebszellen sowie eine hohe Transfektionseffizienz. Die Zellen wurden fortan als Zelllinie weiterkultiviert und verbreitet. Eine genetisch veränderte Variante der 293-Zellen, die 293T-Zellen, exprimieren zusätzlich zu dem Adenovirus 5 eine temperatursensitive Mutante des großen T-Antigens des Simian Virus 40 (SV40), welches die Replikation von Plasmiden mit einem „SV40 origin of replication“ in eukaryotischen Zellen ermöglicht.

3.1.2.2 Kultivierung

Die 293T-Zellen wurden in DMEM-Medium, welches mit 10 % FBS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin angereichert wurde, bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % in 25 cm² Flaschen kultiviert. Dreimal pro Woche fand ein Mediumwechsel statt. Bedeckten die Zellen den Boden der Kulturflasche vollständig, wurden diese durch ein leichtes Klopfen der Flasche mechanisch abgelöst und ein Zehntel der Zellsuspension in eine neue Flasche mit frischem Medium passagiert.

3.1.2.3 PC12-Zellen

Die Zelllinie PC12 wurde 1976 aus einem adrenalen Phäochromocytom einer Ratte aus dem Stamm New England Deaconess Hospital gewonnen und etabliert (Greene and Tischler, 1976). PC12-Zellen gleichen in ihrem Phänotyp dem von chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks und bilden mit einem Durchmesser von bis zu 350 nm chromaffine Vesikel aus, welche die synthetisierten Catecholamine Dopamin und Noradrenalin aber kein Adrenalin (Warren and Chute, 1972; DeLellis et al., 1973) beinhalten. Durch Stimulation mit dem Nervenwachstumsfaktor NGF bilden die PC12-Zellen einen Phänotyp von sympathischen Neuronen des vegetativen Nervensystems aus. Im genaueren bedeutet dies, dass die Zellen nicht mehr proliferieren, sich ihre Zellkörper ausgehend von einer runden Form abflachen und mit dem Auswachsen von Neuriten beginnen (Tischler and Greene, 1975).

Für diese Arbeit standen drei stabil-transfizierte PC12-Zelllinien zur Verfügung, welche von Stork et al. (2004) zuvor beschrieben wurden. Eine der drei Linien exprimierte Ndr2 als Fusionsprotein mit EGFP (EGFP-Ndr2). Hierfür wurden PC12-Zellen mit dem linearisierten pEGFP-C1 Vektor, in dessen MCS die cDNA der murinen Ndr2 eingebaut vorlag, transfiziert. Die Zelllinie EGFP-Ndr2 Mutante exprimierte eine mutierte Form von Ndr2 als Fusionsprotein mit EGFP. Mithilfe des QuickChange-Mutagenesis-System und speziell synthetisierter Primer wurde im Gen der Kinase Ndr2 zwei Punktmutationen generiert, wodurch diese Form von Ndr2 in den Positionen 282 und 442 ihrer Proteinprimärsequenz anstelle der Aminosäure Serin beziehungsweise Threonin die Aminosäure Alanin kodierte. Zellen der Linie EGFP, welche nur mit dem Vektor pEGFP-C1 transfiziert wurden und somit nur das Markerprotein EGFP synthetisieren, dienten für die Versuche als Kontrolle.

3.1.2.4 Kultivierung

Die Kultivierung der drei PC12-Zelllinien EGFP-Ndr2, EGFP-Ndr2 Mutante und EGFP geschah in Kulturschalen (Ø 30 mm) bei einer Temperatur von 37 °C, einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer Luftfeuchtigkeit von 95 %. Die Zellen wuchsen in RPMI-1640 Medium, welches mit 10 % HS (v/v), 5 % FBS (v/v), 2 mM L-Glutamin sowie, zur Selektionierung transgener Zellen, mit 100 µg/ml Geneticin (v/v) angereichert wurde. Die Zellen wurden dreimal pro Woche auf ein Drittel ihres Volumens reduziert und mit frischem Medium auf 2 ml aufgefüllt.

3.1.3 Pharmakologische Untersuchungen zur Differenzierung von PC12-Zellen

3.1.3.1 Beschichtung der Deckgläschen

Bei 180 °C für 16 h steril gebackene Deckgläschen (12 x 24 mm) wurden in die Mitte einer Kulturschalen (Ø 30 mm) platziert und mit 300 µl PDL-Lösung bzw. Kollagen IV-Lösung (siehe Tab. 3.5) beschichtet. Während aufgrund des Ethanol bei der Kollagen IV-Beschichtung die Lösung verdampfte und die trockenen Deckgläschen anschließend bei 4 °C gelagert werden konnten, wurden die PDL-beschichteten Deckgläschen, nach einer Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur, mit sterilem ddH₂O dreimal für 30 min gewaschen, anschließend luftgetrocknet und bei 4 °C gelagert.

Tabelle 3.5: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

PDL-Lösung (steril filtriert)	Kollagen IV-Lösung (steril filtriert)
0,1 mg/ml PDL	0,1 mg/ml Kollagen IV (gelöst in 0,25 % Eisessig (v/v))
0,15 M Borsäure pH 8,4	30 % Ethanol (v/v)

3.1.3.2 Aussäen von PC12-Zellen

Aus den Kulturen der drei PC12-Zelllinien EGFP-Ndr2, EGFP-Ndr2 Mutante und EGFP wurde zunächst, nachdem die Zellen resuspendiert wurden, 1 ml entnommen und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reagensgefäß überführt und bei 300 x g für 5 min in einer 3 °C temperierten Tischzentrifuge zentrifugiert (5415 R, Eppendorf, D). Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 1 ml Differenzierungsmedium (siehe Tab. 3.6) resuspendiert und mithilfe einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Aus der Zellsuspension der jeweiligen Linien EGFP-Ndr2, EGFP-Ndr2 Mutante und EGFP wurden nun das entsprechende Volumen, welches 10 x 10⁴ Zellen enthielt, entnommen und auf ein Endvolumen von 300 µl mit Differenzierungsmedium aufgefüllt. Die Zelllösung wurde nun anschließend auf PDL- bzw. Kollagen IV-beschichtete Deckgläschen, welche in Kulturschalen lagen, ausplattiert und zur Adhäsion für drei Stunden in den Inkubator (C200, Labotect Labor-Technik-Göttingen GmbH) gestellt. Anschließend wurde das Medium auf ein Volumen von 2 ml aufgefüllt und die Differenzierung der Zellen durch eine Zugabe von 50 ng/ml (v/v) NGF 2.5 S stimuliert. Die verwendete Konzentration des Wachstumsfaktors wurde aus Greene und Tischler (1976) übernommen. Die Kultivierung der Zellen erfolgt für vier Tage, wobei nach zwei Tagen das Medium gewechselt wurde.

Tabelle 3.6: Zusammensetzung des verwendeten Mediums

Differenzierungsmedium
RPMI-1640
0,2 % HS (v/v)
2 mM L-Glutamin
400 µg/ml Geneticin

3.1.3.3 Behandlung von PC12-Zellen mit dem Disintegrin Obtustatin sowie mit Magnesiumchlorid

Zellen der PC12-Zelllinien EGFP-Ndr2, EGFP-Ndr2 Mutante und EGFP wurden auf PDL- bzw. Kollagen IV-beschichteten Deckgläschen ausgesät und mit 50 ng/ml (v/v) NGF 2.5 S sowie zusätzlich entweder mit 140 μ M Obtustatin oder mit 300 mM Magnesiumchlorid vier Tage lang behandelt. Die eingesetzte Menge an Obtustatin wurde an Hand von Vorversuchen mit der Kontrollzelllinie EGFP bestimmt. Die eingesetzte Menge an Magnesiumchlorid ergab sich aus vorhergehenden Versuchen, wo der Einfluss extrazellulärer Kalziumionen auf die Ndr2-vermittelte neuronale Differenzierung von PC12-Zellen untersucht wurde (siehe Kapitel Einleitung Abs. 1.1.6). Der Versuch erfolgte mit drei unabhängigen Wiederholungen, wobei eine Negativkontrolle für jede Linie parallel mitgeführt wurde.

3.1.3.4 Fixierung von PC12-Zellen

Am Ende der viertägigen Inkubationszeit wurden die PC12-Zellen zuerst kurz mit warmen PBS gewaschen und anschließend mit einer 37 °C warmen PFA-Fixierlösung für 15 min (siehe Tab. 3.7) inkubiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen erneut dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen auf einen Objektträger mit Immu-Mount fixiert und bis zur mikroskopischen Auswertung lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

Tabelle 3.7: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen

0,1 M PBS pH 7,4 (autoklaviert)	PFA-Fixierlösung
10 mM Dinatriumhydrogenphosphat	4 % PFA (w/v)
1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat	0,1 M PBS
140 mM Natriumchlorid	
7 mM Kaliumchlorid	

3.1.3.5 Morphologische Auswertung

Für die Analyse des Einflusses unterschiedlicher Behandlungen auf die Differenzierung von PC12-Zellen, wurden mit dem inversen Mikroskop Axiovert 200M (Zeiss, Jena, D) und der dazugehörigen Software AxioVision jeweils fünf zufällig ausgewählte Bereiche pro Deckgläschen mit einer zehnfachen Vergrößerung im Phasenkontrast I aufgenommen. Die Auswertung der Bilder erfolgte ebenfalls mit der oben genannten Software. Pro Bild wurde zunächst die Gesamtzahl aller Zellen bestimmt und, um die Differenzierung der unterschiedlichen PC12-Zelllinien spezifischer untersuchen zu können, die Zahl der Zellen, welche einen oder mehrere Neuriten mit einer Länge über 100 μ m ausbildeten, sowie die Zahl stark adhärerender Zellen ermittelt (siehe Abb. 3.3). Als stark adhärent wurden Zellen eingestuft, wenn diese einen weit ausgebreiteten und abgeflachten Zellkörper aufwiesen. Die ermittelten Zahlen der drei Auswertungsgruppen wurden anschließend für alle fünf Bilder gemittelt. Mithilfe der Software Excel (Microsoft Office 2000), wurden die Mittelwerte der Zellen mit Neuriten über 100 μ m und stark adhärerender Zellen prozentual zum Mittelwert der Gesamtzahl aller Zellen gesetzt und in Diagrammen graphisch dargestellt.

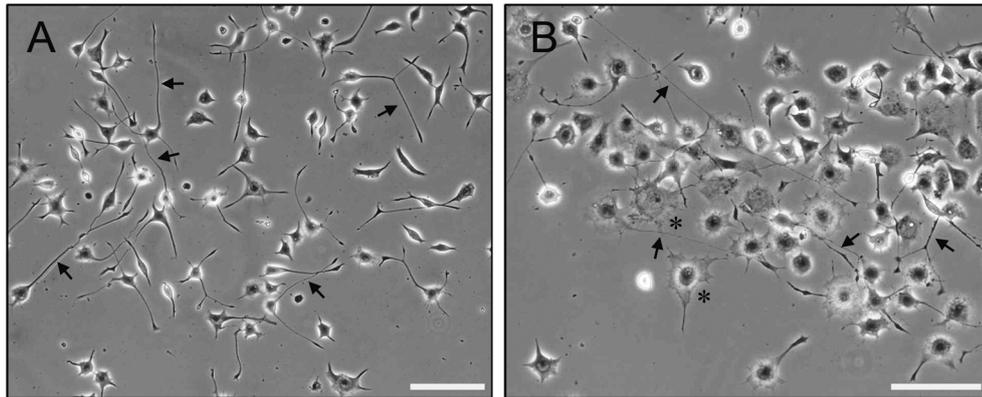


Abbildung 3.3: Morphologische Differenzierung von PC12-Zellen auf unterschiedlichen Substraten

A PC12-Zellen der Linie EGFP-Ndr2 wurden auf PDL-beschichteten Deckgläsern ausplatziert und vier Tage lang mit NGF stimuliert. Zu sehen sind viele Zellen, welche sehr lange Neuriten ausgebildet haben. Einige dieser Neuriten sind über $100\ \mu\text{m}$ lang (mit Pfeilen markiert). **B** PC12-Zellen der Linie EGFP-Ndr2 wurden auf Kollagen IV kultiviert und ebenfalls für vier Tage mit NGF inkubiert. Neben der Ausbildung sehr langer Neuriten (Pfeile), zeigen die Zellen auf diesem Substrat ebenfalls eine starke Zellabflachung (mit Sternchen markierte Beispielzellen). Maßstab: A & B $100\ \mu\text{m}$

3.1.3.6 Statistische Analyse

Die gewonnenen Daten, erhoben aus den einzelnen Versuchen (siehe Abs. 3.1.3.3), wurden mit einer multivariaten Varianzanalyse (ANOVA) statistisch ausgewertet. Ergab der Test der jeweiligen Zwischensubjekteffekte einen Unterschied zwischen den einzelnen Zwischensubjekt-faktoren (Zelllinie, Beschichtung und Behandlung) einen Unterschied von $p < 0,05$, wurde anschließend ein *Post-Hoc*-Test nach Fischer's Protected Least Significant Difference (PLSD) durchgeführt. Alle statistischen Analysen wurden mittels der Software PASW Statistics durchgeführt. Die Darstellung der Daten erfolgte als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (MW \pm SFM).

3.2 Verhaltensbiologische Methoden

3.2.1 Mausstämme

Die Mauslinie C57BL/6 ist der am meisten in der Forschung und für die Generierung von genetisch veränderten Mausmutanten verwendete Inzuchtstamm und wurde von C.C. Little (1921), dem Gründer der Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA), aus einer weiblichen Maus mit der Bezeichnung 57 gezüchtet. Für diese Arbeit wurden nur C57BL/6-Mäuse bzw. transgene Mäuse, welche aus diesem Stamm generiert wurden, verwendet. Dabei handelt es sich bei allen verwendeten Mauslinien um Inzuchtstämme, das heißt Brüder und Schwestern aus einer Generation wurden über mindestens 20 Generationen immer wieder miteinander verpaart. Auf diese Weise erhält man Tiere, welche, ausgenommen von spontan auftretenden Mutationen, einen identischen Genotypen aufweisen und somit in experimentellen Versuchen untereinander vergleichbar sind.

3.2.1.1 Haltung

Für die Zucht der einzelnen Mausstämme wurden Dauerverpaarungen mit jeweils einem Männchen und zwei Weibchen in einem Käfig zusammengesetzt. Die Haltung der Zuchtpaare erfolgte in einem individuell ventilierten Käfigsystem, welches mit einer Belüftungseinheit (IVC-System der Firma Techniplast, Hohenpeißenberg, D) verbunden war. Dabei erfolgte die Zufuhr der HEPA-Filter gereinigten Luft über einen Deckel, welcher fest mit dem aus Polycarbonat bestehenden Käfig (Typ 2 lang) verschlossen wurde. Die Tiere wurden einmal pro Woche unter einer Sterilbank (BS 48, Techniplast) in saubere Käfige umgesetzt, um sie so vor möglichen Kreuzkontaminationen zu schützen und um Allergien auslösenden Staub zu reduzieren. Nach vier Wochen wurden die Nachkommen der Zuchtpaare abgesetzt. Tiere, welche für experimentelle Versuche vorgesehen waren, wurden in eine konventionelle Haltung überführt, d.h. die Tiere wurden in Gruppen von 2-6 Tieren in offene Makrolonkäfige (Ebeco, Castrop-Rauxel, D) gehalten. Sowohl in der IVC-Haltung als auch in der konventionellen Haltung wurden die Käfige und die mit Trinkwasser befüllten Flaschen vor dem Gebrauch autoklaviert. Alle Käfige wurden anschließend mit Holzgranulateinstreu (Lignocel BK 8/15, J. Rettenmaier und Söhne, Rosenberg, D) und pelletiertem Mäusealleinfutter (Ssniff R/M-HV-1534, Ssniff Spezialdiäten, Soest, D) sowie Trinkwasser *ad libitum* ausgestattet. Beide Maustierhaltungsweisen erfolgten in speziellen, klimatisierten Räumen in denen ein, über die Beleuchtung gesteuerter, umgekehrter 12 h-Tag-12 h-Nacht-Rhythmus (19.00 Uhr automatisches Einschalten der Beleuchtung) herrschte. Die Tierversuche und die Haltung der Tiere erfolgte mit der Genehmigung des Regierungspräsidium Halle (AZ 42502-2-862 Uni MD und 203.h-42502-2-862).

3.2.2 Bilaterale Implantation von Führungskanülen in die basolaterale Amygdala

Für die Untersuchung der Bedeutung der Aktindynamik für die Konsolidierung sowie Re-konsolidierung des Furchtgedächtnisses wurden adulte acht bis zwölf Wochen alte männliche C57BL/6JBomTac-Mäuse bilateral eine Injektionskanüle in die basolaterale Amygdala transplantiert. Vor der Operation wurden die Tiere gewogen, mit Isofluran narkotisiert und mit Pentobarbital (50 mg/kg Körpergewicht i.p.) anästhesiert. Die Wirkung der Anästhesie wurde über den Augenblinkreflex sowie über die periphere Schmerzempfindung überprüft. Zeigte das Tier keine Reflexantwort mehr, wurde dessen Kopf über den Oberkiefer sowie den Gehörgängen in einen stereotaktischen Rahmen (WPI, Berlin, D) fixiert. Anschließend wurde das Fell am Kopf der Maus mit einer Schere kurzgeschnitten und mit einem minimalen sagittalen Hautschnitt der Schädel freigelegt. Durch leichtes Abtupfen mit einer 0,2 % Wasserstoffperoxidlösung wurde die Blutung an der Schnittstelle gestoppt und die Schädeloberfläche gereinigt. An Hand von Bregma, dem Kreuzpunkt der Pfeilnaht und der Kranznaht, sowie von Lambda, dem Kreuzpunkt der Pfeilnaht und der Lambdanaht, wurde der Kopf des Tieres waagrecht in einer Ebene ausgerichtet. Die Koordinaten für die Injektion in die basolaterale Amygdala wurden aus dem Hirnatlas von Franklin und Paxinos (2008) entnommen. Ausgehend von Bregma wurde am stereotaktischem Rahmen der Punkt 1,8 mm posterior und 1,7 mm lateral (anteriore-posteriore Achse: -1,8 mm, lateral: $\pm 1,7$ mm) auf jeder Schädelhälfte eingestellt und als Eintrittsstelle für die Injektionskanüle markiert. Mit einem Bohrer (Omni Drill 35, WPI) wurde nun an diesen Markierungen, ohne die Hirnhäute zu verletzen, ein im Durchmesser 1 mm großes Loch in den Schädelknochen gebohrt. Kurz hinter Lambda wurde ein weiteres Loch in den Schädel ge-

bohrt. Dieses diente später für ein Befestigen des Zementsockels mit einer Schraube. Die 10 mm langen Führungskanülen wurden aus handelsüblichen sterilen Kanülen der Größe G 22 ($\varnothing 0,7$ mm) von der Firma Terumo hergestellt und autoklaviert. Mit einem Winkel von 10° zur Mittellinie hin, wurde nun eine Kanüle durch ein Loch langsam bis zu einer Tiefe von 4,5 mm (dorso-ventrale Achse: 4,5 mm) direkt in die BLA eingeführt (siehe Abb. 3.4). Nachdem beide Führungskanülen in das Gehirn der Maus platziert wurden, konnten diese mit Zinkphosphatzement fixiert werden. Da der Zement schnell porös wird, musste dieser mit Kallocryl (Kunststoffkaltpolymerisat) eingeschlossen und zusätzlich mit einer Schraube befestigt. Zur Prophylaxe einer eventuellen bakteriellen Entzündung wurde der Maus zum Schluss das Penicillinpräparat Retacillin intramuskulär injiziert.

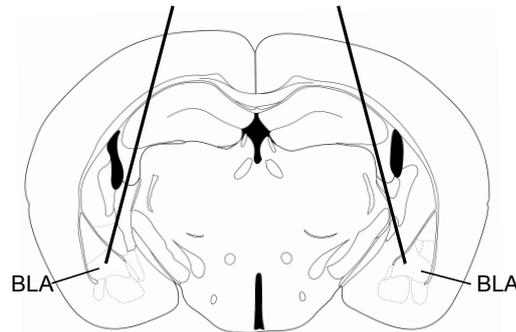


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Position der bilateral implantierten Kanülen in der BLA

Für eine pharmakologische Behandlung mit einer Phalloidinlösung bzw. Vehikellösung (siehe folgenden Abs.) wurden adulten männlichen Mäusen eine Führungskanüle in die basolaterale Amygdala (BLA) beider Hemisphären implantiert.

3.2.3 Auditorische Furchtkonditionierung und intraamygdaläre Injektion

Um den zeitlichen Einfluss der Aktindynamik auf die Gedächtnisbildung zu untersuchen, wurden Mäuse nach einem veränderten Versuchsparadigma trainiert, welches auf dem von Iwan Pawlow entwickelten Modell der klassischen Konditionierung beruht (Pawlow, 1903). Dabei lernt die Maus einen anfänglichen neutralen Stimulus, den sogenannten konditionierten Stimulus (CS^+ z.B. ein Ton), mit einem unkonditionierten aversiven Stimulus (US z.B. ein elektrischer Fußschock), durch eine zeitlich enge Verknüpfung beider Reize, zu assoziieren. Durch ein erneutes Präsentieren des CS^+ wird nun in dem Tier eine Furchtreaktion ausgelöst z. B. Erstarren, dessen Ausprägung Rückschlüsse auf die Stärke des ausgebildeten Furchtgedächtnisses ziehen lässt. Die Versuchskammer sowie das Metallgitter wurden vor jedem neuen Versuchstier mit 70 % Ethanol gereinigt um die Exkremente sowie den Geruch des vorhergehenden Tieres zu entfernen. Fünf Tage nach der Operation begann das Verhaltensexperiment (Abb. 3.5).

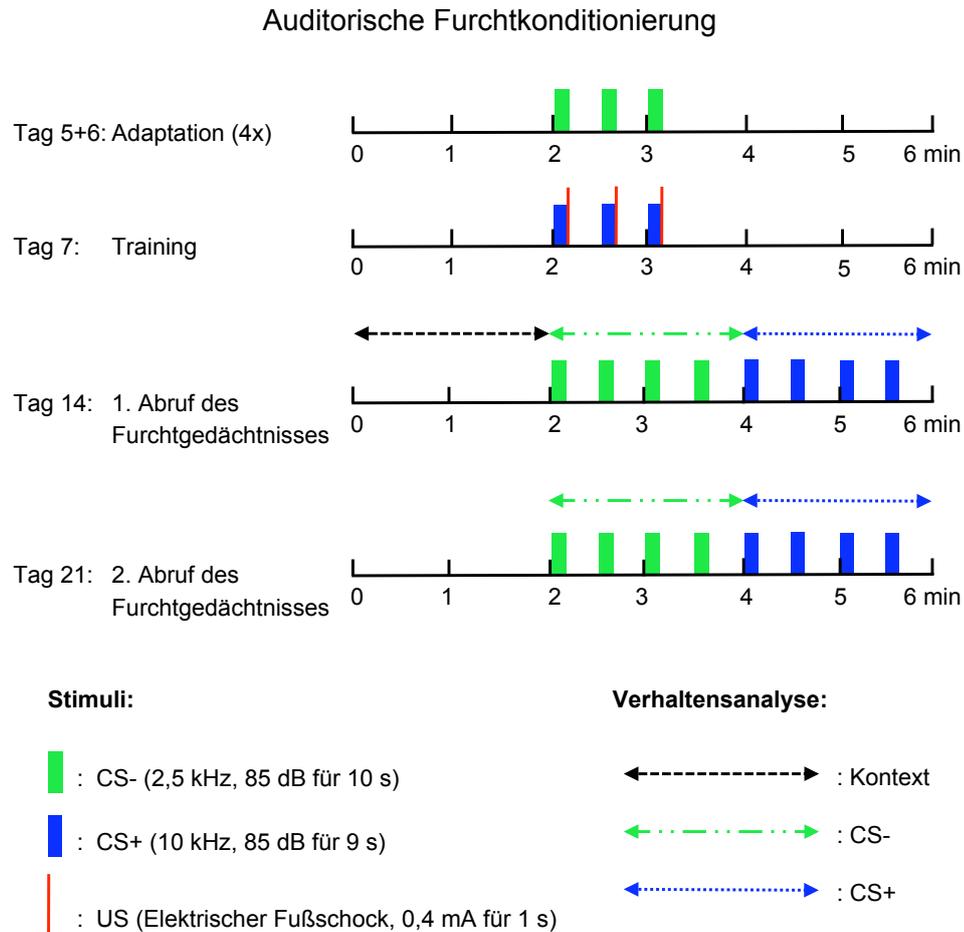


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung des auditorischen Furchtkonditionierungsparadigmas

Am fünften und sechsten Tag nach dem stereotaktischen Einbringen der Führungskanülen erfolgte die Adaptation an die Trainingskammer und den CS⁻. Dafür wurden die Versuchstiere zweimal pro Tag in die Versuchskammer gesetzt und ihnen der CS⁻ (2,5 kHz, grüne Balken) vorgespielt. Am siebten Tag wurden die Tiere trainiert, dabei wurde den Tieren dreimal hintereinander der CS⁺ (10 kHz, blaue Balken) präsentiert, der mit dem US (elektrischen Fußschock von 0,4 mA, rote Balken) koterminierte. Sieben Tage nach dem Training fand der 1. Abruf des Furchtgedächtnisses statt. Hierfür wurden die Tiere wieder in die Versuchskammer gesetzt, wo zunächst die Reaktion der Mäuse auf den Schockkontext (schwarzer Doppelpfeil) aufgezeichnet wurde. Danach erfolgte die Beobachtung der Reaktion der Versuchstiere zuerst auf eine viermalige Präsentation des CS⁻ (grüner Doppelpfeil), gefolgt von einer viermaligen Präsentation des CS⁺ (blauer Doppelpfeil). Nach erneuten sieben Tagen fand der 2. Abruf des Furchtgedächtnisses statt. Hierfür wurde ebenfalls die Reaktion der Versuchstiere auf die Präsentationen des CS⁻ und des CS⁺ aufgezeichnet.

Hierfür wurden die Tiere in einem Furchtkonditionierungssystem der Firma Technical & Scientific Equipment (TSE, Bad Homburg, D) adaptiert, trainiert und anschließend das Furchtgedächtnis der Mäuse in dem gleichen Kontext abgerufen. Die Apparatur bestand aus einer Plexiglaschamber (32 cm x 16 cm x 20 cm; Länge x Breite x Höhe). Als Boden wurde ein Stahlgitter verwendet. Dieses war mit einer Steuereinheit verbunden und ermöglichte die Applikation eines Stroms definierter Intensität und Dauer. Die Kammer

war von zwei variabel verstellbaren Rahmen mit eingebauten Lichtschranken umgeben, mit welchem die lokomotorische Aktivität der Tiere aufgezeichnet werden konnte. Beides befand sich auf einem ausziehbaren Untergestell. Das Ganze wurde von einem undurchsichtigen schallisolierten Kunststoffgehäuse umgeben, welches durch eine Klappe geöffnet werden konnte. Im Inneren des Gehäuses war ein Ventilator, welcher die Tiere mit frischer Luft versorgte (Hintergrundgeräusch 70 dB), sowie eine Lichtquelle (10 Lux) und ein Lautsprecher angebracht.

Zu Beginn der auditorischen Furchtkonditionierung konnten sich die Versuchstiere in vier Adaptationsphasen, welche an zwei Tagen (Tag 5 und 6 siehe Abb. 3.5) stattfanden, an die Trainingsumgebung habituieren. Dabei erkundeten die Mäuse zunächst zwei Minuten lang den Kontext (Kammer, sensorische Reize) bevor diesen mit einem Abstand von 20 s drei aufeinander folgende Töne (CS^-) für jeweils 10 s (2,5 kHz, 85 dB) vorgespielt wurden. Dieser unterschied sich in der Tonhöhe deutlich von dem späteren verwendeten konditionierten Ton (CS^+). Die Tiere verbleiben noch weitere zweieinhalb Minuten in der Kammer bevor sie wieder in ihren Käfig zurückgesetzt wurden. Am sechsten Tag fand die Furchtkonditionierung (Training) der Mäuse statt. Nach erneuten explorieren des Trainingskontextes für 2 min, wurde den Mäusen dreimal hintereinander der konditionierte Stimulus (CS^+) in Form eines Tones (10 kHz, 85 dB) präsentiert, welcher jeweils mit einem gleich darauffolgenden elektrischen Fußschock (US, 0,4 mA, 1 s) gepaart wurde. Anschließend wurden die Tiere wieder für zweieinhalb Minuten in der Versuchskammer belassen bevor sie in ihre Käfige zurückgesetzt wurden.

In bestimmten zeitlichen Abständen (0,5 h, 6 h oder 24 h) nach dem Training (siehe Abb. 3.6) wurde nun einigen Mäusen entweder 0,3 μ l einer Phalloidin- bzw. Vehikellösung (siehe Tab. 3.8) bilateral in die basolaterale Amygdala (BLA) über eine implantierte Führungskanüle injiziert. Hierfür wurden die Tiere wieder mit Isofluran narkotisiert. Die Injektion erfolgte mit einer 2 μ l Hamilton-Spritze, welche über einen Schlauch mit einer 10 mm langen Injektionskanüle (G 23) verbunden war. Das Volumen der Injektionslösung wurde über eine Infusionspumpe (Syringe Infusion Pump SP200iZ, WPI) mit einer Geschwindigkeit von 0,1 μ l/min langsam appliziert.

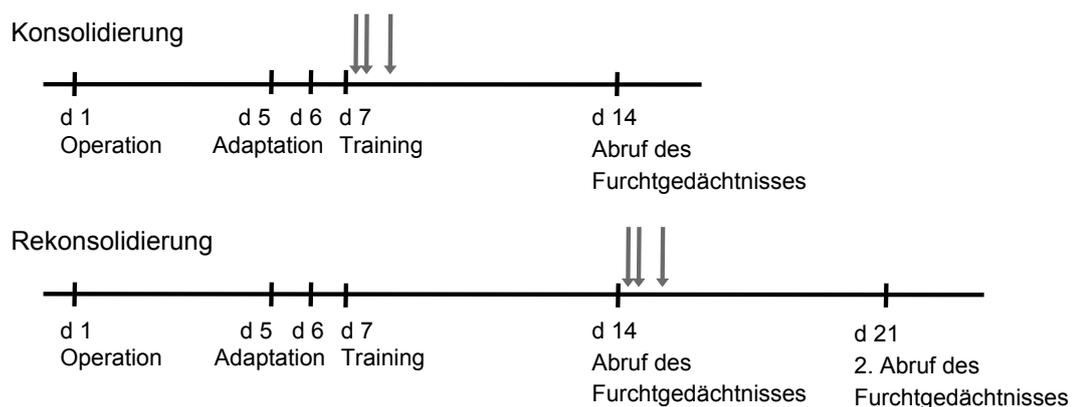


Abbildung 3.6: Experimenteller Zeitverlauf

Für eine pharmakologische Behandlung mit dem Aktindynamikinhibitor Phalloidin, wurden Mäuse entweder 0,5 h, 6 h oder 24 h nach dem Training bzw. 0,5 h, 6 h oder 24 h nach dem 1. Abruf des Furchtgedächtnisses (jeweils mit Pfeilen markiert) eine Phalloidinlösung bzw. Vehikellösung bilateral in die basolaterale Amygdala (BLA) injiziert.

Für ein Ausgleichen des Injektionsdruckes wurde die Kanüle erst ca. 15 min nach der Injektion entfernt. Eine Woche nach der Furchtkonditionierung wurde die Ausprägung des Langzeitfurchtgedächtnisses im Gedächtnistest untersucht (Abruf 1). Hierfür wurden die Tiere wieder in die Trainingskammer gesetzt und für 2 min die Verhaltensreaktion auf den Schockkontext gemessen (Kontext). Darauffolgend wurden den Tieren viermal hintereinander der CS^- und im Anschluss viermal der CS^+ für jeweils 10 s mit einer Unterbrechung von 20 s zwischen den Stimuli präsentiert.

Einer weiteren Gruppe von Mäusen, die zuvor keine Injektion nach dem Training erhalten hatten, wurde nun entweder 0,5 h, 6 h oder 24 h (siehe Abb. 3.6) nach dem ersten Abruf des Furchtgedächtnisses $0,3 \mu\text{l}$ die Phalloidin- bzw. Vehikellösung (siehe Tab. 3.8) bilateral in die BLA injiziert. Die Applikation der Lösung erfolgte entsprechend des oben beschriebenen Ablaufs. Eine Woche nach der Injektion wurden die Mäuse erneut in den Trainingskontext gesetzt und die Furchtreaktion während der Präsentation des Schockkontextes, des CS^- und des CS^+ aufgezeichnet.

Tabelle 3.8: Zusammensetzung des verwendeten Injektionslösungen

Phalloidinlösung	Vehikellösung
$1 U/\mu\text{l}$ Phalloidin-Rhodamin	10 % DMSO (v/v)
10 % DMSO (v/v)	0,9 % Natriumchlorid (w/v)
0,9 % Natriumchlorid (w/v)	

Mithilfe des Computerprogramms Fear Conditioning Software der Firma TSE wurde als Maß für die Ausprägung des Furchtgedächtnisses (gemessen während des ersten und zweiten Abrufens) das Furchtverhalten “Erstarren“ analysiert. Das Erstarren ist definiert als ein Fehlen jeglicher Bewegung mit Ausnahme der Körperbewegung durch Atmung und Herzschlag des Tieres (Blanchard and Blanchard, 1969). Dabei wertete das System durch die Information der Lichtschranken eine Immobilität des Tieres länger als eine Sekunde als Erstarren. Für die statistische Analyse mit dem Programm PASW Statistics wurde die Dauer des Erstarrens als Prozentwert der Gesamtdauer der jeweiligen Stimuluspräsentation (Kontext, CS^- und CS^+ , siehe Abb. 3.5) berechnet.

3.2.4 Erhöhter-Plus-Labyrinth-Test

Der Erhöhte-Plus-Labyrinth-Test (engl. elevated-plus-maze-test) basiert auf der von Montgomery 1955 beschriebenen Methode zur Analyse eines induzierten Angstverhaltens im Verhältnis zu dem explorativen Verhalten eines Tieres, diese ausgelöst werden durch die Exposition eines neuen Reizes. Dabei zeigte er, dass positioniert auf einem Y-Labyrinth (engl. Y-Maze), welches dem Labyrinth des Erhöhter-Plus-Labyrinth-Tests sehr ähnelt, die Tiere immer bevorzugten sich in einem geschlossenen Arm aufzuhalten. Kam es nun zu einer Exposition eines neuen Reizes, in diesem Fall ein offener Arm, löste dies in dem Tier einen Konflikt aus, welcher durch dessen Angst sowie dessen Explorationsdrang getrieben wurde (Pellow et al., 1985).

Für den Test wurde ein 40 cm hohes Plastikkreuz mit vier Armen, welche 60 cm lang und 6 cm breit waren, verwendet. Zwei sich orthogonal gegenüber liegende Arme hatten zusätzlich eine 30 cm hohe Plastikwand (geschlossene Arme). Das Kreuz wurde auf einem 60 cm hohen Tisch platziert. Getestet wurden Mäuse, welche sieben Tage zuvor 6 h nach

dem Furchtkonditionierungstraining entweder eine Injektion einer Phalloidin- bzw. Vehikellösung in die BLA erhalten hatten (siehe Abb. 3.2.3). Unter geringen Lichtverhältnissen (10 Lux) wurde eine Maus in die Mitte des hohen Plastikkreuzes platziert und die Bewegungen des Tieres während der gesamten Dauer des Testes über eine mit dem Computer verbundenen Videokamera aufgenommen. Mittels der ANY-Maze Software wurde automatisch das Verhalten der Maus ermittelt, wie die Aufenthaltsdauer in den offen bzw. geschlossenen Armen sowie die Anzahl der jeweiligen Begehungen in die offenen und geschlossenen Arme. Das prozentuale Verhältnis der Begehungen in die offenen Arme zu der Gesamtzahl der Begehungen des Tieres sowohl in die offenen als auch in die geschlossenen Arme, diente als Indikator für die Stärke des angstähnlichen Verhaltens des Tieres, während die Zahl der Begehungen aller vier Arme Aufschluss über die Aktivität des Tieres gab.

3.2.5 Statistische Analyse

Die erhobenen Daten für das Erstarrungsverhalten, getestet während des ersten bzw. zweiten Abrufs des Furchtgedächtnisses, wurden mit einer multivariaten Varianzanalyse (ANOVA) für die Zwischensubjektfaktoren Behandlung (Phalloidin oder Vehikel), Injektionszeitpunkt (0,5 h, 6 h oder 24 h) und Gedächtnisphase (Konsolidierung und Rekonsolidierung) statistisch ausgewertet. Zeigte der Test der jeweiligen Zwischensubjekteffekte einen signifikanten Unterschied mit $p < 0,05$, so wurde im Anschluss ein *Post-Hoc*-Test nach Fischer's Protected Least Significant Difference (PLSD) durchgeführt.

Die statistische Auswertung des Erhöhten-Plus-Labyrinth-Tests erfolgte ebenfalls mittels eines T-Tests nach Fischer's PLSD wobei die Gesamtzahl der Begehungen aller Arme sowie das prozentuale Verhältnis der Begehungen der offenen Arme zu der Anzahl der Begehungen aller Arme zwischen beiden Behandlungsgruppen (Phalloidin und Vehikel) miteinander verglichen wurden. Alle statistischen Analysen wurden mittels der Software PASW Statistics durchgeführt. Die Darstellung der Verhaltensdaten erfolgt als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (MW \pm SFM).

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Transformation und Aufreinigung von Plasmid-DNA

3.3.1.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen

Für die Transformation und Anreicherung von Plasmid-DNA wurde der K12 Bakterienstamm *E. coli* DH5 α verwendet. Bakterien dieses Stammes sind in ihren Restriktionssystemen defizient (mcrA, mcrB, mmr), wodurch die Transformationseffizienz deutlich gesteigert wird. Des Weiteren sind diese Bakterien in ihrer Rekombinationseigenschaft defekt (recA), was die Stabilität eingeschleuster Plasmid-DNA erheblich erhöht. Auf Grund der vorhandenen Zellwand der gramnegativen *E. coli* Bakterien müssen diese kompetent für die Aufnahme von Fremd-DNA gemacht werden. Dies wurde erreicht, in dem man durch die Behandlung der Zellen mit einer hochkonzentrierten Lösung an zweiwertigen Metallkationen die Zellwand der Bakterien destabilisierte. Eine effiziente Aufnahme an Fremd-DNA in die Bakterien wird während der Transformation durch einen kurzen Hitzeschock gesteigert.

Für die Herstellung kompetenter Bakterien musste zunächst eine Startkultur in 2,5 ml LB-Broth Flüssigmedium (siehe Tab. 3.9) angeimpft werden, welche über Nacht bei 37 °C und 225 rpm in einem Schüttelinkubator (Innova 4200, New Brunswick Scientific, Edison NJ, USA) heranwuchs. Am folgenden Tag wurde die Bakterienkultur 1:50 in 500 ml TYM-Medium (siehe Tab. 3.9) verdünnt und bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,2 bis 0,8 wie vorab beschreiben inkubiert. Die Dichte der Zellen wurde hierfür mit einem Photometer (Nanophotometer, Implen, München, D) bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Nun folgte ein Abkühlen der Zellen für 30 min auf Eis und eine anschließende Zentrifugation mit 4.500 x g bei 4 °C für 20 min (Tischzentrifuge 5804 R, Eppendorf, D).

Tabelle 3.9: Zusammensetzung der verwendeten Medien (alle wurden autoklaviert und auf einen pH Wert von 7,0- 7,2

TYM-Medium	LB-Broth Flüssigmedium	LB-Broth Agar
2 % Tryptone (w/v)	10 g/l Tryptone (w/v)	10 g/l Tryptone (w/v)
0,5 % Hefeextrakt (w/v)	5 g/l Hefeextrakt (w/v)	5 g/l Hefeextrakt (w/v)
0,1 M Natriumchlorid	5 g/l Natriumchlorid (w/v)	5 g/l Natriumchlorid (w/v)
10 mM Magnesiumsulfat		5 g/l Agar (w/v)

In den folgenden Schritten wurde nur auf Eis und mit eisgekühlten Puffern und Plastikmaterial gearbeitet. Nach der Zentrifugation wurde das Bakterienpellet vorsichtig in 100 ml TFB1-Puffer (siehe Tab. 3.10) resuspendiert, für 5 min inkubiert und erneut mit 4.500 x g bei 4 °C für 8 min zentrifugiert. Das Pellet wurde nun in 10 ml autoklavierten TFB2-Puffer (siehe Tab. 3.10) resuspendiert, in 200 µl Volumen aliquotiert und bei –80 °C eingefroren.

Tabelle 3.10: Zusammensetzung der verwendeten Puffer

TFB1-Puffer (pH 5,8 mit 1 M Eisessig, steril filtriert)	TFB2-Puffer (pH 6,8 mit 1 M Kaliumchlorid, steril filtriert)
30 mM Kaliumacetat	10 mM MOPS pH 6,8
10 mM Kalziumchlorid	75 mM Kalziumchlorid
50 mM Manganchlorid	10 mM Kaliumchlorid
100 mM Kaliumchlorid	15 % Glycerol (v/v)
15 % Glycerol (v/v)	

Zur Bestimmung der Transformationseffizienz der chemisch erzeugten kompetenten Zellen, wurden jeweils 100 µl Bakterienlösung mit 2 ng bzw. 10 ng eines Kontrollplasmids transformiert (siehe Abs. 3.3.1.2). Nach 24 h wurden die Kolonien, welche auf einer LB-Broth Agarplatte gewachsen waren (siehe Tab. 3.9), 15 ml LB-Agar in einer Ø 100 mm Kulturschale) ausgezählt und die Transformationseffizienz (angegeben in cfu/µg) mit der folgenden Formel bestimmt:

$$\text{Kolonien [cfu]} \cdot \frac{\text{Transformationsvolumen } [\mu\text{l}]}{\text{Ausplattierungsvolumen } [\mu\text{l}]} \cdot \text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g}] \quad (3.1)$$

3.3.1.2 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* Bakterien

Für eine Transformation wurden bis zu 10 ng Plasmid-DNA mit 50 mM Kalziumchlorid auf ein Volumen von 100 μl aufgefüllt und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die DNA-Lösung mit 100 μl chemisch kompetenter DH5 α Bakterien, welche langsam auf Eis aufgetaut wurden, versetzt und für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Nun folgte ein 45 s langer Hitzeschock der Bakterien bei 42 °C (Thermomixer comfort, Eppendorf, D) sowie ein erneutes Inkubieren auf Eis für 2 min. Die Bakterienlösung wurde danach mit 800 μl SOC Medium (siehe Tab. 3.11) aufgefüllt und bei 37 °C im Thermomixer für 1 h mit 350 rpm geschüttelt. Während dieses Inkubationsschrittes bildeten die Bakterien die im Plasmid kodierte Antibiotikaresistenz aus, welche im folgenden Schritt der Selektion dienste. Zum Schluss wurden 200 μl der Bakterienlösung auf eine LB-Broth Agarplatte (siehe Tab. 3.9) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Dabei enthielt der Agar das entsprechende Antibiotikum (Kanamycin 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Ampicillin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) gegen dieses transformierte Bakterien eine Resistenz aufwiesen.

Tabelle 3.11: Zusammensetzung des verwendeten Mediums

SOC Medium (autoklaviert)
20 g/l Trypton
5 g/l Yeast Extrakt
0,58 g/l Natriumchlorid
0,19 g/l Kaliumchlorid
10 mM Magnesiumchlorid
10 mM Magnesiumsulfat pH 7

3.3.1.3 Herstellung von *E. coli* Glycerinkulturen

Mit einer autoklavierten Pipettenspitze wurde eine Kolonie der transformierten Bakterien, welche auf einer LB-Broth Agarplatte herangewachsenen waren, gepickt und 2 ml LB-Broth Flüssigmedium (siehe Tab. 3.9), welches ebenfalls ein geeignetes Antibiotikum zur Selektion enthielt (Kanamycin 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Ampicillin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), beimpft. Die Bakterien vermehrten sich über Nacht bei 37 °C und 225 rpm in einem Schüttelinkubator (Innova 4200, New Brunswick Scientific, D). Am nächsten Tag wurden 800 μl dieser Kultur mit 800 μl einer 87 % Glycerinlösung (v/v) gemischt und bei –80 °C eingefroren.

3.3.1.4 DNA-Präparation über Anionenaustauschersäulen

Für Transfektionen in der Zellkultur wurden große Mengen an endotoxinfreier Plasmid-DNA-Lösung benötigt. Um eine mögliche Kontamination von Endotoxinen vorzubeugen, wurden die Bakterien nur in gebackener Glasware (180 °C für 16 h) kultiviert. Für die Aufarbeitung der Zellen wurde mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit von Qiagen gearbeitet, welcher endotoxinfreie Puffer und Lösungen beinhaltetete.

Eine 5 ml Startkultur (LB-Broth Flüssigmedium (siehe Tab. 3.9) mit entsprechendem Antibiotikum (Kanamycin 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Ampicillin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurde mit einer Kolonie einer auf einer Agar-Platte angewachsenen Bakterienkultur beimpft. Alternativ wurde mithilfe einer ausgeglühten Impföse etwas Bakterienmaterial einer Glycerinkultur abgenommen

und in 5 ml LB-Broth Flüssigmedium, welches ein geeignetes Antibiotikum zur Selektion enthielt, resuspendiert. Die Inkubation der Kultur erfolgte schüttelnd bei 37 °C. Nach ca. 8 h wurde von der Bakterienkultur eine 1:1000 Verdünnung in 100 ml LB-Broth Flüssigmedium, versetzt mit einem entsprechenden Antibiotikum, angesetzt, die über Nacht im Schüttelinkubator heranwuchs. Am nächsten Tag wurde die Kultur mit 6.000 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert (5804 R). Das Pellet wurde anschließend in 10 ml P1-Puffer (siehe Tab. 3.12) resuspendiert und durch Zugabe des gleichen Volumens an alkalischem P2-Puffer wurden die Zellen durch das enthaltende SDS lysiert. Der stark alkalische pH führte zudem zur Denaturierung genomischer DNA und Plasmid-DNA. Durch eine Umpufferung zu einem neutralen pH Wert durch eine Zugabe von 10 ml P3-Puffer wurde nur die Plasmid-DNA wieder renaturiert und blieb somit löslich während die an Proteinen und Zellwandbruchstücken hängende chromosomale DNA im folgenden Schritt herausfiltriert wurde. Zudem sorgte die hohe Salzkonzentration ebenfalls für ein Ausfällen des SDS, welches die Bindung der Plasmid-DNA an die Anionenaustauschersäule Lösung verhindert hätte. Nachdem die Plasmid-DNA unter den Salzbedingungen der mit QBT-Puffer zuvor äquilibrierte Säule gebunden hatte, wurde diese mit 30 ml QC-Puffer zweimal gespült, um vorhandenen Proteine und unverdaute RNA heraus zu waschen. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte im Anschluss in Gegenwart hoher Salzkonzentration durch die Applikation von 15 ml QF-Puffer. Durch Zugabe von Isopropanol, mit einem auf das Ausgangsvolumen bezogenen 70 %en Volumenanteil, konnte die DNA präzipitiert und in einem anschließenden Zentrifugationsschritt (5804 R) mit 20.000 x g für 30 min bei 4 °C pelletiert. Zum Schluss wurde das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, erneut für 10 min mit 15.000 x g bei 4 °C zentrifugiert und nach dem Trocknen an der Luft in 0,5 ml TE Puffer aufgenommen.

Tabelle 3.12: Zusammensetzung des verwendeten Puffer

P1-Puffer	P2-Puffer	P3-Puffer
50 mM Tris-HCL pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml Ribonuklease A	200 mM NaOH 1 % SDS (w/v)	3 M Kaliumacetat pH 5,5
QBT-Puffer	QC-Puffer	QF-Puffer
750 mM Natriumchlorid 15 % Isopropanol (v/v) 0,15 % Triton X (v/v) 50 mM Mops pH 7,0	1 M Natriumchlorid 50 mM Mops pH 7,0 15 % Isopropanol (v/v)	1,25 M Natriumchlorid 50 mM Tris-HCL pH 8,5 15 % Isopropanol (v/v)
TE-Puffer		
1 mM EDTA 10 mM Tris-HCL pH 8,0		

3.3.2 Bestimmung der DNA-Konzentration mittels Photometrie

Die Konzentration der DNA wurde anschließend spektrometrisch mit dem NanoPhotometer (Implen, München, D) bestimmt. Die optische Dichte doppelsträngiger DNA wurde bei 260 nm ermittelt und mithilfe der Formel:

$$c [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \cdot VF \cdot MF \quad (3.2)$$

die Konzentration ermittelt. Die Variablen VF bzw. MF kennzeichnen den Verdünnungsfaktor bzw. den Multiplikationsfaktor, welcher für für doppelsträngige DNA 50 beträgt. Dieser ergibt sich aus der Beobachtung, dass doppelsträngige DNA bei einer Weglänge des Lichtes von 10 mm bei einer OD_{260} von 1 ungefähr eine Konzentration von $50 \mu\text{g/ml}$ aufweist. Für RNA ergibt sich eine Konzentration von $40 \mu\text{g/ml}$, $33 \mu\text{g/ml}$ bei einzelsträngiger DNA und etwa $20 \mu\text{g/ml}$ bei Oligonukleotiden. Eine gleichzeitige Bestimmung der optischen Dichte von Proteinen bei 280 nm und die Berechnung des Verhältnisses von OD_{260}/OD_{230} zeigte die Reinheit der DNA-Lösung an. Als optimal gilt ein Wert von $\geq 1,8$ für DNA Lösungen. Die Extinktion bei einer Wellenlänge von 230 nm gibt Auskunft über weitere Verunreinigungen z.B. mit Polysacchariden und Salze. Der Wert aus dem Verhältnis OD_{260}/OD_{230} sollte daher über 2,0 liegen.

3.3.3 Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanzspitzen

Für die Bestimmung des Genotypes transgener Mäuse wurde mithilfe des Viagen Direct-PCR-Tail Reagenz die genomische DNA aus einer ca. 0,5 cm langen Mausschwanzspitze isoliert. Die gewonnene DNA-Lösung wies nicht die Reinheit auf, wie man sie nach einer Ethanol- oder Phenol/Chloroform-Fällung erhält, beeinträchtigte aber nicht die darauffolgende PCR (siehe Abs. 3.3.4) und somit war der mit dieser Methode verbunden geringe Zeitaufwand entscheidend. Die präparierten Mausspitzen wurden in $200 \mu\text{l}$ Lyse-Reagenz mit frisch zugebender ProteinaseK ($0,3 \text{ mg/ml}$) über Nacht rotierend (Hybrid 2000, H. Sauer Laborbedarf, Reutlingen, D) bei 55°C lysiert. Die Reaktion wurde am darauffolgenden Tag bei 85°C für 45 min in einem Wasserbad (A103, Lauda Dr. R. Wobser, Lauda-Königshofen, D) inaktiviert und die Proben bei -20°C gelagert.

3.3.4 Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Das Prinzip der PCR beruht auf der selektiven Amplifikation einer spezifischen DNA Sequenz und wurde von Kary B. Mullis etabliert (Mullis et al., 1986). Die Entwicklung dieser Methode war der Ausgangspunkt für vieler bis *dato* nicht mögliche analytischen Untersuchungen und Manipulationen z.B. der Erforschung von Variationen im Genom des Menschen, der Entdeckung viraler Pathogene sowie ein weiterführendes hocheffizientes Klonieren von DNA-Sequenzen. Im ersten Schritt der PCR wird die DNA, welche zu Beginn als komplexe, hochmolekulare Struktur vorliegt, durch einen initialen Denaturierungsschritt für 5 min bei 95°C in ihre Einzelstränge aufgetrennt. Mittels der sich wiederholenden Zyklen von drei unterschiedlichen Temperaturstufen wird die DNA zuerst bei 94°C für 15 s min denaturiert. Dann folgt die Anlagerung (Annealing) der sequenzspezifischen Primer-Oligonukleotide (Primer) an die komplementären DNA-Stränge (Matrize). Die Annealing-Temperatur wird an die Schmelztemperatur der Primer angepasst um eine spezifische Bindung zu garantieren. Im weiteren Schritt wird die Temperatur nun auf 72°C erhöht, was dem Aktivitätsoptimum der verwendeten, thermostabilen Taq DNA Polymerase entspricht. Die erstmals 1988 von Saiki et al. (1988) beschriebene Verwendung dieser aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* stammenden Polymerase revolutionierte die Methode. Die bis *dato* verwendete DNA Polymerase I aus *E. coli* musste für jeden neuen Zyklus erneut dazugegeben werden, da sie durch den sich an die DNA-Synthesephase anschließenden Temperaturanstieg auf 94°C ebenfalls denaturiert wurde. Die Taq DNA Polymerase ermöglicht eine schnelle Verlängerung (Extension) der Primer und somit die Synthese des zur Matrize komplementären DNA-Stranges (Elongation). Die für die Elongation benötigte

Zeit ist dabei abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes. Auf die Elongation folgt wieder die Denaturierung. Durch aufeinanderfolgende Zyklen (in der Regel 30 bis 35) von einem Denaturierungs-, Annealings- und Elongationsschritt wird eine exponentielle Vermehrung des gewünschten DNA-Fragmentes erreicht, da jeder neu gebildete Strang als Matrize für die Synthese eines weiteren Stranges genutzt werden kann.

Für eine Genotypisierung transgener Mäuse wurde für die PCR mit den Puffern und Reagenzien aus dem Taq-DNA-Polymerase Kit der Firma Qiagen (Hilden, D) gearbeitet. Dabei wurde 1 μ l des DNA-Lysats aus einer Mausschwanzspitze (siehe Abs. 3.3.3) mit 0,05 U/ μ l Taq-DNA-Polymerase, 800 μ M dNTPs, 1 x CoralLoad PCR-Puffer, 1 x Q-Solution, 10 pM Primer (jeweils) mit ddH₂O auf ein Volumen von 10 μ l aufgefüllt. Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma Invitrogen (Karlsruhe, D) und wurden lyophilisiert sowie HPLC aufgereinigt und entsalzen geliefert. Der CoralLoad PCR-Puffer enthielt neben 1,5 mM Magnesiumchlorid unter anderem die Salze Kaliumchlorid und Diammoniumsulfat, welche eine größere Toleranz in der Annealing-Temperatur der Primer sowie der Magnesiumchloridkonzentration zulässt. Darüber hinaus ermöglichte die Zusammensetzung des Puffers im Anschluss an die PCR ein direktes Laden der Proben auf ein Agarosegel ohne den Zusatz eines Probenpuffers. Bei einigen PCR-Ansätzen wurde die Konzentration an Magnesiumchlorid durch Zugabe von zusätzlichem Magnesiumchlorid erhöht (Ndr2-Transgen PCR: 1,6 mM MgCl₂, Camk2a-cre PCR: 2,75 mM MgCl₂). Die jeweilige PCR wurden wie in der Tab. 3.13, 3.14 und 3.15 beschrieben in einem Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems Inc., Foster City CA, USA) durchgeführt. Des Weiteren sind die für jede Reaktion verwendeten Primer unter jeder Tabelle aufgelistet.

Tabelle 3.13: PCR Programm Ndr2-Transgen Genotypisierung

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	94°C	15 s	
Primerbindung	52°C	30 s	
DNA-Synthese	72°C	2 min	35 x
Abschließender Synthese-Schritt	72°C	7 min	
Sense-Primer (5'-3'): CGT GCA CAA ACC AAA ATC AG			
Antisense-Primer (5'-3'): CGT GCA CAA ACC AAA ATC AG			

Tabelle 3.14: PCR Programm Camk2a-cre Genotypisierung

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	94°C	30 s	
Primerbindung	60°C	30 s	
DNA-Synthese	72°C	30 s	30 x
Abschließender Synthese-Schritt	72°C	7 min	
Sense-Primer (5'-3'): ACG ACC AAG TGA CAG CAA TG			
Antisense-Primer (5'-3'): CTC GAC CAG TTT AGT TAC CC			

Tabelle 3.15: PCR Programm EGFP-Ndr2 Insert-Orientierung

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	94°C	15 s	
Primerbindung	55°C	30 s	
DNA-Synthese	72°C	2 min	30 x
Abschließender Synthese-Schritt	72°C	7 min	
Sense-Primer (5'-3'): ACG AGC CGG AAG CAT AAA GTG TAA AG			
Antisense-Primer (5'-3'): GGG GGA GAT GGG GAG AGT GAA G			

3.3.5 Agarosegel-Elektrophorese

Um die Größe der amplifizierten PCR-Produkte zu kontrollieren, wurden diese im Anschluss in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei werden einzelne DNA-Moleküle, welche in einem großen pH-Bereich durch Phosphatreste stets negativ geladen sind, durch die anliegende Spannung in einem Agarosegel in Richtung der Anode nach ihrer Basenlänge aufgetrennt. Durch das Mitführen eines entsprechenden DNA-Größenmarkers, welcher unterschiedlich lange DNA-Fragmente definierter Länge enthält, können die DNA-Moleküle identifiziert werden. Zu beachten ist, dass das Laufverhalten der DNA im Gel durch bestimmte Faktoren wie deren Form, besonders entscheidend bei ringförmiger Plasmid-DNA, der Art des Laufpuffers etc. verändert wird. Mithilfe der Zugabe an Ethidiumbromid, welches in die doppelsträngige Nukleinsäure interkaliert und im UV-Bereich (254-366 nm) fluoresziert, kann die DNA im Gel sichtbar gemacht werden. Die eingesetzte Menge an Agarose wurde in Abhängigkeit von der zu erwartenden Fragmentgröße bestimmt, d. h. für DNA-Fragmente mit bis zu 600 bp wurde die Agarose 2% (w/v) und für größere Produkte 0,7-1,5% (w/v) eingesetzt. Die Agarose wurde durch ein kurzes Aufkochen in einer Mikrowelle (Clatronic MWG 746H, Clatronic, Kempen, D) in 100 ml 1 x TAE Puffer (siehe Tab. 3.16) gelöst.

Tabelle 3.16: Zusammensetzung des verwendeten Puffers

50 x TAE-Puffer (1 l)
242 g Tris
57,1 ml Essigsäure
100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0

Nach Zugabe von Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in die nicht mehr kochende Lösung gegeben, wurde das Agarosegel in eine horizontale Gelkammer (AGT3 & maxi VG, VWR, Darmstadt, D) gegossen und mit einem Kamm für die Geltaschen versehen. Nach dem Erstarren des Gels, wurde dieses mit 1 x TAE-Puffer bedeckt und die Proben, wenn nötig, mit 1/6 ihres Volumens an 6fach konzentriertem Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte dann mithilfe eines Netzgerätes (Power Source 300, VWR) bei ca. 100 V.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Immunpräzipitation (IP)

Bei der Immunpräzipitation wird mithilfe eines spezifischen Antikörpers und einer Matrix, welche diesen Antikörper bindet, gezielt Proteine und dessen zusammen als Proteinkomplex vorliegenden Bindungspartnern aus einem Proteingemisch angereichert und anschließend isoliert (siehe Abb. 3.7). Die am häufigsten verwendete Matrix besteht aus Protein A- bzw. Protein G-Sepharosekonjugaten. Diese in der Zellwand von Bakterien vorkommenden Proteine (Protein A aus *Staphylococcus aureus* und Protein G aus *Streptococcus species*) besitzen am C-Terminus drei homologe Bindungsdomänen, welche eine hohe Affinität für die Fc-Region vieler Immunglobuline des Isotypes IgG von Säugetieren aufweisen. Diese Bindung hat dabei keine Auswirkung auf die Antigen-Antikörper-Interaktion.

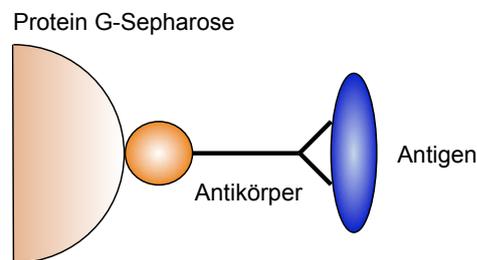


Abbildung 3.7: Model des Protein G-Sepharose gekoppelten Antigen-Antikörper-Komplexes

Über einen für das Zielprotein (Antigen) spezifischen Antikörper, dieser z.B. an die G-Sepharose gekoppelt vorliegt, wird das zu untersuchende Protein zusammen mit seinen als Proteinkomplex vorliegenden Bindungspartnern aus einem Gemisch isoliert und anschließend präzipitiert.

3.4.1.1 IP zur Bestimmung der Expression des EGFP-Ndr2 Fusionsproteins in CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg} transgenen Mäusen

Das Vorderhirn einer adulten Maus wurde in 3 ml Ripa-Lysierungspuffer (siehe Tab. 3.17) mit dem Dispergiergerät Polytron PT 1300D (Kinematica AG, Luzern, CH) zerkleinert und in einem PTFE-beschichteten Handhomogenisator (Wheaton Industries Inc. Millville NJ, USA) auf Eis dissoziiert. Alle weiteren Schritte wurden entweder auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. Das Lysat inkubierte unter Rotation (Stuart SB3, Bibby Scientific Limited, Staffordshire, GB) für 2 h und wurde anschließend mit 16.000 x g für eine Stunde zentrifugiert (5415 R). Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration des Überstandes (siehe Abs. 3.4.4), wurde das Volumen, welches 1 mg Gesamtprotein enthielt, abgenommen und mit Lysierungspuffer auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt. Es folgte eine Inkubation des Proteingemisches mit 50 µl gewaschener Protein G-Sepharose für eine Stunde. Dieser Schritt diente zur Entfernung möglicher endogener Antikörper, welche eine Verunreinigung des Präzipitates verursachen würden. Das Gemisch wurde bei 12.000 x g für 30 s zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und das gereinigte Proteingemisch mit 5 µg goat anti-GFP Antikörper über Nacht rotierend inkubiert. Am folgenden Tag wurde zu dem Proteingemisch 50 µl Protein G-Sepharose dazugegeben, so dass sich unter Rotation innerhalb von 4 h der Protein G-Sepharose-Antigen-Antikörper-Komplex

Tabelle 3.17: Zusammensetzung der verwendeten Puffer

Ripa-Lysierungspuffer	Waschpuffer
50 mM Tris-HCL pH 8	50 mM Tris-HCL pH 8
150 mM Natriumchlorid	
1 % Nonidet P-40	
0,5% Natriumdeoxycholat	
0,1 % SDS	
1 mM PMSF	
Complete Proteinaseinhibitor	

ausbilden konnte. Durch Zentrifugation bei 12.000 xg wurde der Komplex präzipitiert und dreimal mit eiskaltem Lysierungspuffer und einmal mit Waschpuffer für jeweils 5 min rotierend gewaschen. Zwischen jedem Waschschrift wurde das Präzipitat erneut abzentrifugiert. Mit einer 10 μ l Hamiltonspritzen wurde zum Schluss der Überstand vom Pellet abgenommen und dieses mit 50 μ l 1 x Probenpuffer (siehe Tab. 3.21) für 10 min bei 98 °C im Thermocycler inkubiert. Die Detektion einer Immunpräzipitation erfolgte nach Auftrennung über eine SDS-PAGE (Abs. 3.4.5) durch Detektion der nachfolgend auf einer PVDF-Membran geblotteten Proteine (siehe Abs. 3.4.6).

3.4.1.2 Koimmunpräzipitation zur Bestimmung potentieller Interaktionspartner von Ndr2

Durch die Koimmunopräzipitation können mögliche Protein-Protein-Interaktionen nachgewiesen werden. Für die Aufreinigung der endogenen Ndr2-Kinase und dessen potentiellen Interaktionspartnern, wurde ein von der Firma Pineda generierter, aus einem Kaninchen stammender, polyklonaler Antikörper gegen Ndr2 verwendet. Dieser erkennt eine zehn Aminosäure lange Sequenz der Kinase (AS 230-240). Da der Nachweis präzipitiertem Ndr2 ebenfalls nur mit dem gleichen Antikörper möglich war, wurden für die Immunpräzipitation TrueBlot anti-rabbit-Ig IP Beads und für die Detektion der auf eine PVDF geblotteten Ndr2-Kinase der HRP-gekoppelte TrueBlot anti-rabbit-IgG Antikörper von der Firma eBioscience verwendet. Beim ersteren handelt es sich um Sepharose-Kügelchen, welche mit einem aus der Ziege stammenden anti-Kaninchen Antikörper gekoppelt vorlagen. Der verwendete Sekundärantikörper erkennt vorzugsweise nur die native und nicht die reduzierte Form von Antikörpern. Da dieser nicht an die schwere (MW ca. 55 kDa) bzw. an die leichte Kette (MW ca. 23 kDa) des reduzierten und denaturierten Ndr2 Antikörpers bindet, war der Nachweis präzipitierten Ndr2, welches ein Molekulargewicht von ca. 54 kDa aufweist, somit möglich.

Für die Gewinnung der Proteinproben wurde das Gehirn einer C57 BL/6JBomTac Maus in 5 ml Lysierungspuffer (siehe Tab. 3.18) wie im oberen Abs. 3.4.1.1 beschrieben homogenisiert, lysiert und ungelöste Zellbestandteile bei 16.000 xg für eine Stunde zentrifugiert (5415 R). Pro Immunpräzipitation wurden 500 μ g Gesamtprotein in 1 ml Lysierungspuffer und 50 μ l TrueBlot anti-rabbit-Ig IP Beads für 1 h bei 4 °C unter kontinuierlicher Rotation vorgereinigt. Alle weiteren Schritte erfolgten entweder bei 4 °C oder gekühlt auf Eis. Im Anschluss wurden die Sepharose-Kügelchen bei 10.000 xg für 3 min abzentrifugiert (5415 R) und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nun folgte ein einstündiger Inkubationsschritt des Proteingemisches mit 5 μ l des von der Firma Pineda

generierten anti-Ndr2 Antikörpers bei kontinuierlicher Rotation. Darauf hin wurde das Gemisch mit 50 μl TrueBlot anti-rabbit-Ig IP Beads über Nacht ebenfalls unter Rotation inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Probe mit 10.000 x g für 3 min abzentrifugiert und sechsmal für jeweils 5 min mit 1 ml Lysierungspuffer gewaschen. Zwischen jedem Waschschrift wurde das Präzipitat zentrifugiert und der Überstand verworfen. Am Ende des letzten Schrittes wurde mit einer Hamiltonspritze der letzte Rest des Lysierungspuffers vollständig von dem Pellet abgenommen und im Anschluss mit 50 μl 1 x Probenpuffer (siehe Tab. 3.21) für 10 min bei 98 °C gekocht und somit alle präzipitierten Proteine denaturiert. Zum Schluss folgte ein letzter Zentrifugationsschritt und der Transfer des Überstandes mithilfe einer 10 μl Hamiltonspritze in ein neues Eppendorfgefäß. Die Proben wurden bis zur Auftrennung mittels SDS-Gelelektrophorese sowie der Detektion immunpräzipitierter und koimmunpräzipitierter Proteine (siehe Abs. 3.4.5 und 3.4.6), bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Tabelle 3.18: Zusammensetzung des verwendeten Puffers

Lysierungspuffer
1 % Nonidet P-40 (v/v)
150 mM Natriumchlorid
25 mM Tris-HCL pH 8
2 mM EDTA
1 mM PMSF
Complete Proteinaseinhibitor

3.4.2 Subzelluläre Fraktionierung mittels Gradientenzentrifugation

Native PC12-Zellen wurden in zwei 75 cm² Flaschen mit jeweils einem Volumen von 20 ml Medium kultiviert. Bildeten die Zellen einen dichten Zellrasen am Boden der Flaschen, wurden diese mithilfe eines Zellschabers geerntet, in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und bei 300 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert (5804 R). Im Anschluss an einem Waschschrift mit kaltem PBS (siehe Tab. 3.27) wurde das Pellet in 700 μl Lysierungspuffer mithilfe eines PTFE-beschichteten Handhomogenisators (Wheaton Industries Inc.) auf Eis dissoziiert und inkubiert. Währenddessen wurde der kontinuierlicher Saccharosegradient (10-40 %) hergestellt. Hierfür wurde in die eine Kammer eines Gradientenmischers (Hoefer Inc., San Fransisco CA, USA) 1,8 ml einer 10 %igen bzw. in die andere Kammer 1,8 ml einer 40 %igen Saccharoselösung (siehe Tab. 3.19) gegeben und mithilfe einer Schlauchpumpe (Reglo Analog MS-2/8, Ismatec, Glattbrugg, CH) erst die 40 %tige Lösung und gleich darauf die 10 %tige Lösung gleichstark angesaugt.

Tabelle 3.19: Zusammensetzung der verwendeten Puffer

Lysierungspuffer	Saccharose-Lösung
250 mM Saccharose	10 % bzw. 40 % Saccharose (w/v)
100 mM Triethanolamin	100 mM Triethanolamin
100 mM Eisessig	100 mM Eisessig
1 mM EDTA	1 mM EDTA
1 mM PMSF	1 mM PMSF
Complete Proteinaseinhibitor	Complete Proteinaseinhibitor

So entstand in einem Ultrazentrifugenröhrchenen durch tropfenweises Übersichten der Lösung ein kontinuierlicher Saccharosegradient (siehe Abb. 3.8). Dieser wurde anschließend mit dem Zellysat überschichtet und über Nacht bei 4 °C in dem Ausschwingrotor TH 660 einer Sorvall Ultrazentrifuge (Thermo Fischer Scientific, Waltham MA, USA) bei 75.500 x g zentrifugiert. Am darauffolgenden Tag wurde vorsichtig der Gradient von oben beginnend in zehn Fraktionen a 420 μ l Volumen aliquotiert und bei –80 °C bis zum Laden der Proben auf ein SDS-Gel (siehe Abs. 3.4.5) gelagert.

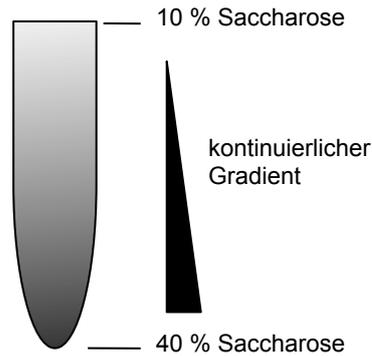


Abbildung 3.8: Model eines kontinuierlichen Saccharosegradienten

Beginnend mit einem 40%igen Saccharoseanteil wurde durch langsames Übersichten ein bis zu einem 10%igen Saccharoseanteil gehender kontinuierlicher Gradient aufgebaut.

3.4.3 Präzipitation und Aufreinigung von Aktinfilamenten aus murinerem Hirngewebe

Für die Untersuchung des Gehaltes an G-Aktin sowie hoch verzweigten und schwach verzweigten F-Aktin nach einer Phalloidin-Injektion in die BLA, würden Mäuse wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben mit Pentobarbital narkotisiert und operiert. Den Tieren wurde aber keine Führungskanüle in die Amygdala implantiert, sondern nur mit den gleichen stereotaktischen Koordinaten beschrieben wie in Abschnitt 3.2.2 (von Bregma ausgehend anteriore-posteriore Achse: -1,8 mm, lateral: \pm 1,7 mm, dorso-ventrale Achse: 4,5 mm) und einem Winkel von 10° eine 2 μ l Hamilton Spritze in die basolaterale Amygdala platziert. Dadurch konnte eine akute Injektion von 5 μ l Phalloidin- bzw. 5 μ l Vehikellösung (siehe Tab. 3.20) bilateral in die BLA appliziert werden. Das Volumen der Injektionslösung wurde über eine Infusionspumpe (Syringe Infusion Pump SP200iZ, WPI) mit einer Geschwindigkeit von 0,1 μ l/min langsam appliziert und für ein Ausgleichen des Injektionsdruckes wurde die Kanüle ca. 15 s nach der Injektion erst entfernt. Die Gehirnentnahme aus den injizierten Tieren erfolgte anschließend entweder 10 min, 30 min, 2 h oder 6 h nach der Injektion. Folgte eine Gehirnentnahme erst 2 h bzw. 6 h nach der akuten Injektion wurde durch Zunähen der Kopfhaut mit 3 Stichen die freigelegte Schädelfläche nach der Operation wieder bedeckt. Da die Tiere innerhalb einer Stunde nach der Operation wieder aus der Pentobarbitalnarkose erwachten, wurden die Mäuse vor der Gehirnentnahme mit Isofluran erneut betäubt. Die narkotisierten Tiere wurden durch eine zervikale Dislokation getötet worauf das Gehirn der Tiere auf Eis herauspräpariert und mit kaltem PBS gespült wurde. Mithilfe einer Maushirn-Metallmatrix-Ausstechvorrichtung der Firma Zivic instruments Inc. (Pittsburgh PA, USA) wurden die Hirne in 2 mm dicke Scheiben geschnitten. Durch das Anfärben der Injektionslösung (Phalloidin-Rhodamin sowie Vehikel) mit Methylen-

blau wurde nun mit einer Stechvorrichtung, welche ebenfalls von der o.g. Firma bezogen wurde, das injizierte Gewebe der BLA herausgestantzt und in 120 μ l HES-Lysierungspuffer (siehe Tab. 3.20) überführt.

Tabelle 3.20: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer

Phalloidin-Rhodaminlösung	Vehikellösung
1 U/ μ l Phalloidin-Rhodamin	10 % DMSO (v/v)
10 % DMSO (v/v)	0,9 % Natriumchlorid (w/v)
0,9 % Natriumchlorid (w/v)	1 % Methylenblau (w/v)
1 % Methylenblau (w/v)	
	HES-Lysierungspuffer
	20 mM HEPES pH 7,2
	1 % Triton-X (v/v)
	1 mM EDTA
	0,25 M D-Saccharose
	1 mM PMSF
	Complete Proteinaseinhibitor

Die Aufreinigung der einzelnen subzellulären Aktinpols erfolge nach einem modifizierten Protokoll von Rosentreter et al. (2007). Hierfür wurde das gewonnene Gewebe mithilfe eines PTFE-beschichteten Handhomogenisators (Wheaton Industries Inc.) auf Eis dissoziiert und 10 min inkubiert. Zum Entfernen der Zellkerne sowie nicht lysierter Zellen, wurde das Lysat für 10 min bei 500 x g zentrifugiert (5415 R). Dieser und sämtliche darauffolgende Zentrifugationsschritte fanden bei 4 °C statt. Der Überstand, welcher den Input für die Aktinfällung darstellt, wurde nun in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Für eine Bestimmung der Ausgangsproteinkonzentration wurden 5 μ l der Lösung entnommen und wie in Abschnitt 3.4.4 ermittelt. Die restliche Lösung wurde nun bei 15.000 x g für 30 min zentrifugiert (5415 R). Am Ende diesen Schrittes erhält ein Pellet, welches das hoch verzweigte F-Aktin (HV F-Aktin) enthält. Dieses Pellet wurde entsprechend dem Volumen des Überstandes in Lysierungspuffer resuspendiert, aliquotiert und bei –80 °C bis zur Analyse mittels SDS-Gelelektrophorese (siehe Abs. 3.4.5) sowie Western-Blot (siehe Abs. 3.4.6) eingefroren. Der Überstand wurde nun in ein 1,5 ml Microfuge Tube überführt und in einer Ultrazentrifuge (Beckmann und Coulter, Krefeld, D) mit 100.000 x g für 1 h zentrifugiert. Am Ende dieses Schrittes erhielt man zwei Fraktionen, ein Pellet, welches das schwach verzweigte F-Aktin (SV F-Aktin) enthielt sowie einen Überstand, welcher das globuläre Aktin (G-Aktin) beinhaltete. Das Pellet wurde ebenfalls dem Volumen des Überstandes entsprechend wieder in Lysierungspuffer resuspendiert. Beide Fraktionen wurden aliquotiert und bei –80 °C eingefroren. Alle Fraktionen von Aktin (F- und G-Aktin) wurden mittels elektrophoretischer Auftrennung in einem 15 % SDS-Gel sowie der immunologischen Detektion mithilfe des pan-Aktin Antikörpers auf einer PVDF-Membran nachgewiesen (siehe Abs. 3.4.5 und 3.4.6).

3.4.4 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Menge an Proteinen erfolgte mit dem Biorad *DC* Protein Assay, welcher auf der von (Lowry et al., 1951) beschriebenen Methode basiert. Durch die Zugabe

einer alkalischen Lösung welche Kupfer(II)-tartrat (Solution A) enthielt, entstand ein Proteinkupferkomplex, welcher wiederum durch die Zugabe einer zweiten Lösung (Solution B) das in dieser Lösung enthaltende Folin reduzierte und so ein blauer Farbumschlag zu beobachten war. Die Absorption der Lösung konnte nun bei 750 nm gemessen (Gerät) werden. Die Proteinkonzentration wurde an Hand des Verlaufes einer Standardkurve ermittelt. Für diese wurde die Absorption unterschiedlicher genau definierter Mengen eines Proteins wie z. B. BSA, welches in dem gleichen Puffer wie die zu bestimmende Proteinprobe gelöst wurde, bestimmt und zusammen mit der Proteinkonzentration graphisch aufgetragen. Es wurden nur Kurven für die Ermittlung der Proteinkonzentration einer bestimmten Probe verwendet, wo der Anstieg der Regressionsgeraden der einzelnen Punkte größer als 0,97 war.

3.4.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch die Bindung des Natriumdodecylsulfat (engl. Abkürzung SDS) an Proteine mit einem konstanten Ladungs- zu Masse-Verhältnis (1,4 g SDS pro g Protein) werden diese denaturiert und Protein-Protein-Wechselwirkungen unterbunden. Die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe können nun mit der Verwendung des von Laemmli (1970) erstmals beschriebenen diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophoresesystem in einem elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Doch zuerst werden die Komplexe in einem Sammelgel (5 % Acrylamid) bei einem pH-Wert von 6,8 durch die Glycin-Kationen fokussiert. Im sich anschließenden Trenngel mit einem pH-Wert von 8,8 liegt die Aminosäure Glycin als neutrales Zwitterion vor, so dass sich die SDS-Protein-Komplexe in Richtung Anode entsprechend ihres Molekulargewichtes auftrennen können.

3.4.5.1 Probenvorbereitung

Die Proteinproben werden vor dem Auftragen auf das Gel mit einem Drittel ihres Volumens an 4 x Probenpuffer (siehe Tab. 3.21) versetzt.

Tabelle 3.21: Zusammensetzung des verwendeten Puffers

4 x Probenpuffer
252 mM Tris-HCL pH 6,8
8 % SDS (w/v)
40 % Glycerol (v/v)
0,04 % Bromphenolblau (w/v)

Für den größten Teil der verwendeten Antikörper, mussten des weiteren durch Zugabe von reduzierenden Thiolverbindungen, z.B. β -Mercapthoethanol (5 % Endkonzentration) zu den Proben, die Schwefelbrücken zwischen den Cysteinen innerhalb der Proteine aufgespalten werden. Die Proben wurden nun für 5 min auf 95 °C erhitzt, um durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken Tertiär- und Sekundärstrukturen aufzubrechen. Anschließend erfolgte die Lagerung der Proben, bis zum Auftragen, auf Eis.

3.4.5.2 Gelelektrophorese

Unter der Verwendung des Mini VE Gelelektrophorese- und Elektrotransfersystems von Hoefer (San Francisco CA, USA) wurden 1 mm dicke Polyacrylamidgele wie folgt hergestellt: In ein Elektrophorese-Modul wurde das Trenngel (siehe Tab. 3.22) gegossen und mit destilliertem Wasser überschichtet um eine gerade Trennlinie zu erhalten. Nach dem dieses auspolymerisiert war, wurde es mit dem Sammelgel (siehe Tab. 3.22) überschichtet.

Tabelle 3.22: Reagenzien zur Herstellung von Trenn- und Sammelgelen

Reagenzien	Trenngel		Sammelgel
	8 %	10 %	5 %
ddH ₂ O	8,37 ml	7,12 ml	3,4 ml
30 % Acrylamid 37,5 : 1	4,77 ml	6 ml	0,83 ml
1,5 M Tris-HCL pH 8,8	4,5 ml	4,5 ml	—
1,0 M Tris-HCL pH 6,8	—	—	0,63 ml
10 % SDS	0,18 ml	0,18 ml	0,05 ml
10 % APS	0,18 ml	0,18 ml	0,05 ml
TEMED	0,018 ml	0,018 ml	0,005 ml

Das Modul wurde nun in die Elektrophoresekammer, welche zuvor mit Laufpuffer befüllt wurde, eingespannt, mit den Proteinproben beladen und ebenfalls mit Laufpuffer (siehe Tab. 3.23) befüllt. Mit dem Netzgerätes E844 der Firma Consort (Turnhout, B) erfolgte die Elektrophorese zunächst bei 10 mA bis die Bromphenolaufront das Ende des Sammelgels erreichte. Die Auftrennung der Proteine im Trenngel erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA.

Tabelle 3.23: Zusammensetzung des verwendeten Puffers

Laufpuffer
25 mM Tris
250 mM Glycin
0,1 % SDS (w/v)

3.4.6 Western-Blot

In Anlehnung an den von Towbin et al. (1979) beschriebenen Protokoll, wurden Proteine aus einem SDS-Gel (SDS-PAGE) im Nass-Western-Blot-Verfahren elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran immobilisiert. Dabei wurde die auf die Größe des Gels zurechtgeschnittene Membran auf Grund ihrer Hydrophobizität zuerst in 100 % Methanol aktiviert und kurz in ddH₂O gewaschen. Nun folgte eine Äquilibration von vier Blättern Filterpapier, der Membran sowie des SDS Gels für 10 min im gekühlten Transferpuffer (siehe Tab. 3.24). Anschließend wurde auf die Anode des Mini VE Nass-Blot-Modules (Hoefer Inc.) zwei Lagen Filterpapier gelegt und mit der Membran, dem Gel und zwei weiteren Lagen Filterpapier luftblasenfrei überschichtet. Zum Schluss wurde das Modul geschlossen, mit Transferpuffer aufgefüllt und in die Elektrophorese-Kammer (Mini VE Hoefer) eingespannt. Der Transfer erfolgte in einem Eisbad bei einer konstanten Stromstärke von

400 mA (Netzgerätes E844, Consort) für eine Stunde. Die Zusammensetzung des Transferpuffers richtete sich je nach dem ob nur ein bestimmtes Protein über eine immunologische Reaktion auf der Membran detektiert werden sollte oder mehrere mit sehr unterschiedlicher Größe.

Tabelle 3.24: Zusammensetzung der verwendeten Puffer

Transferpuffer		
Proteine 20-100 kDa	Proteine > 100 kDa	Proteine < 50 kDa
25 mM Tris	25 mM Tris	25 mM Tris
192 mM Glycin	192 mM Glycin	192 mM Glycin
0,1 % SDS (w/v)	0,1 % SDS (w/v)	20 % Methanol (v/v)
20 % Methanol (v/v)		

3.4.7 Färbung membrangebundener Proteine

Nach dem Beenden des Proteintransfers wurde die Effizienz des „Blottings“ durch eine reversible Ponceau S-Färbung der Proteine auf der PVDF-Membran überprüft. Hierfür wurde zunächst die Membran in ddH₂O gespült, für 5 min mit Ponceaulösung (siehe Tab. 3.25) gefärbt und anschließend wieder mit ddH₂O gewaschen bis Proteinbandenmuster zu erkennen waren. Die Membran wurde daraufhin mit Wasser vollständig entfärbt und zum vollständigen Fixieren der Proteine an die Membran getrocknet. Die Membran wurde nun wieder mit 100 % Methanol aktiviert, konnte aber auch für eine spätere Verwendung im Dunkeln bei -20 °C gelagert werden.

Tabelle 3.25: Zusammensetzung der verwendeten Lösung

Ponceaulösung
0,2 % Ponceau S (w/v)
3 % Essigsäure (v/v)

3.4.8 Immunologische Detektion membrangebundener Proteine

Durch eine Antikörper spezifische Enzymreaktion lassen sich Proteine auf einer Membran detektieren. Doch zunächst wurden unspezifische Proteinbindungsstellen der Membran mit 5 % Milchpulver in TBST (siehe Tab. 3.26) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Blockierlösung abgenommen und die Membran mit dem Primärantikörper in 2,5 % Milchpulver/TBST über Nacht inkubiert. Die verwendeten Primärantikörper wurden entsprechend der Angaben der Hersteller bzw. aus den Vorversuchen resultierenden Ergebnissen in unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt. Diese Angaben sind in der Tab. 2.1 im Kapitel Material aufgelistet. Im Anschluss wurden unspezifische gebundenen Antikörper durch dreifaches Waschen (siehe Tab. 3.26) der Membran für jeweils 10 min entfernt. Es folgte eine einstündige Inkubation mit dem entsprechenden Sekundärantikörper, welcher sich gegen die Epitope des Wirtes in dem der Primärantikörper gebildet wurde, richtete. Der Sekundärantikörper lag dabei als Konjugat mit dem Meerrettichperoxidase Enzym vor. Nach erneutem Waschen wurde die Membran mit einer ausreichenden Menge des Detektionsmittels ECL plus überschichtet und für

5 min schüttelnd inkubiert. In Anwesenheit des Katalysators Wasserstoffperoxid wird das im Kit enthaltene Substrat Luminol (ein zyklisches Diazylhydrazid) durch die Meerrettichperoxidase oxidiert. Eingepackt in Frischhaltefolie kann nun das von der Membran durch Chemilumineszenz abgegebene Lichtsignal mithilfe der in dem Gerät LAS 1000 (Fuji Photo Film Co., LTD, Tokio, JPN) vorhandenen CCD-Kamera detektiert und mit der Software Image Reader LAS-1000 Pro analysiert werden. Die Expositionszeit variierte dabei zwischen 1 min und 60 min. Durch eine spezifische Bindung des Sekundärantikörpers an den Antigen-Primärantikörper-Komplex wird so die zu untersuchende/n Proteinbande/n auf der Membran sichtbar.

Tabelle 3.26: Zusammensetzung der verwendeten Puffer

TBS	TBST	Waschpuffer
50 mM Tris-HCL pH 7,5	0,5 % Tween 20 (v/v)	0,1 % Tween 20 (v/v)
150 mM Natriumchlorid	TBS	TBS

3.5 Immunzytochemie

3.5.1 Fixierung von Zellen

3.5.1.1 PFA-Fixierung mit anschließender Permeabilisierung

Die Zellen wurden zuerst kurz mit vorgewärmten PBS gewaschen und anschließend mit einer 37 °C warmen PFA-Fixierlösung (siehe Tab. 3.27) 15 min lang fixiert. Zum Schutz der fragilen Neuriten hippokampaler Primärneurone, enthielt die Lösung zum Fixieren der Neurone zusätzlich 4 % Saccharose. Für PC12-Zellen war die Zugabe nicht notwendig. Nach der Fixierung wurden die Zellen dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und für 10 min mit 0,3 % TritonX/PBS permeabilisiert. Nach erneutem Waschen mit PBS, wurden die Zellen bis zur Weiterbehandlung in PBS bei 4 °C gelagert.

Tabelle 3.27: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen

0,1 M PBS pH 7,4 (autoklaviert)	PFA-Fixierlösung
10 mM Dinatriumhydrogenphosphat	4 % PFA (w/v)
1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat	4 % D-Saccharose (w/v)
140 mM Natriumchlorid	0,1 M PBS
7 mM Kaliumchlorid	

3.5.1.2 Methanol-Fixierung

Für die Epitoperkennung einiger Antikörper bedurfte es statt PFA, die Fixierung der Zellen mit Methanol. Im Gegensatz zur PFA-Fixierung bei der eine Proteinvernetzung stattfindet, präzipitieren die Proteine während der Methanol-Fixierung. Hiefür wurden die Zellen mit –20 °C kalter Methanolfixierlösung (siehe Tab. 3.28) für 5 min fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS, wurden die Zellen für weiterführende immunzytochemische Färbungen (siehe Abs. 3.5.2) in PBS bei 4 °C gelagert. Aufgrund der fettlösenden Eigenschaft von Methanol bedurfte es keiner weiteren Permeabilisierung der Zellen.

Tabelle 3.28: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen

MES-Puffer	Methanolfixierlösung
100 mM MES pH 6,9	90 % Methanol (v/v)
1 mM EGTA	10 % MES-Puffer (v/v)
1 mM Magnesiumchlorid	

3.5.2 Immunfluoreszenzfärbung

Für die Detektion von zytosolischen sowie membrangebundenen Proteine, wurden die fixierten und permeabilisierten Zellen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 5 % Serum in PBS (siehe Tab. 3.27) inkubiert um unspezifische Antikörperbindungen zu blockieren. Die Herkunft des Serums richtete sich je nach Tierspezies aus welcher die Sekundärantikörper stammten. Wurden Antikörper aus zwei unterschiedlichen Spezies verwendet, wurde mit 5 % BSA in PBS blockiert. Verdünnt in der Blockierlösung wurden die Zellen über Nacht bei 4 °C mit den Primärantikörpern inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen dreimal für 10 min mit PBS gewaschen. Gerichtet gegen spezifische Epitope der Tiere aus denen die jeweiligen Primärantikörper stammten, wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern mit einer Verdünnung von 1:1000 mit 2 % BSA in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI dient zur Markierung chromosomaler DNA in Zellen und wurde in dieser Arbeit für die Detektion des Zellkörpers von Neuronen eingesetzt. Im Anschluss an die Immunreaktion wurden die Zellen zunächst dreimal mit PBS für jeweils 3 min gewaschen und dann mit 600 nM DAPI/PBS lichtgeschützt inkubiert. Es folgte ein erneuter Waschschriff und das Fixieren der Deckgläschen mit Immu-Mount auf einem Objektträger. Bis zur mikroskopischen Auswertung wurden die Objektträger lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

3.5.3 Mikroskopische Auswertung immunfluoreszenzgefärbter Zellen

Mithilfe des inversen Mikroskops DMI6000 der Firma Leica Microsystems (Wetzlar, D), welches mit einer Quecksilberdampfampe sowie einer CCD-Kamera ausgestattet war, konnte über die zugehörige Steuersoftware LAS AF (V 2.2.0 build 4758) das Fluoreszenzsignal immunzytochemisch gefärbter Zellen aufgenommen und analysiert werden. Dabei wurden in der z-Ebene mehrere Schichten aufgenommen, wobei Anfang und Ende des z-Stapels vom Auftreten zellspezifischer Fluoreszenzsignale bestimmt waren.

Gegenüber der konfokalen Laserscanningmikroskopie birgt die Epifluoreszenzmikroskopie einige Nachteile. Bei dieser Technik werden nicht nur jene Fluorophore angeregt, die in einer Fokusebene liegen, sondern auch solche über und unter dieser Ebene. Somit liegt in der Epifluoreszenz stets eine Überlagerung von Signalen vor und einzelne fluoreszenzmarkierte Proteine können nicht voneinander getrennt betrachtet werden. Aus diesem Grund wurde das Fluoreszenzsignal von allen aufgenommenen Bildern, mit in der Software enthaltenen Zusatzapplikationen, dekonvolviert. Die Dekonvolution ist ein auf einen Algorithmus basierendes mathematisches Verfahren, welches in der Bildverarbeitung eingesetzt wird, um die einzelnen Bildsignale zu schärfen. Dabei wird über die PSF-Matrix (engl. Point spread function), welche die Lichtstreuung der einzelnen Lichtpunkte wiedergibt, der Ursprungsort jedes einzelnen Signales zurückgerechnet und somit alle

Bildinformationen ihrem Ursprung zugewiesen (Nasse and Woehl, 2010; Sibarita, 2005; Wang, 2007). Für diese Arbeit wurden sämtliche Fluoreszenzbilder dekonvolviert und im Anschluss, mithilfe des Computerprogrammes Adobe Photoshop CX3 (Extended 10.0.1), die Einzelbilder eines z-Stapels zu einem Bild zusammengefügt und der Kontrast sowie die Helligkeit im Bild angepasst.

3.5.4 Intensitätsanalyse des Fluoreszenzsignals immunzytochemisch markierter Proteine

Zunächst wurden PC12-Zellen der drei Linien EGFP-Ndr2, EGFP-Ndr2 Mutante und EGFP auf PDL bzw. Kollagen IV ausplattiert und zur Differenzierung vier Tage mit NGF stimuliert. Nach der Fixierung der Zellen wurde mithilfe der Immunzytochemie (siehe oberen Abs.) β 1-Integrin spezifisch mit einem Fluorophor markiert. Mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop Meta 510 (Zeiss, Jena, D) und der Software LSM 510 wurden die Zellen anschließend bei 100facher Vergrößerung und unter Einbeziehung der z-Ebene vertikal in $0,2\ \mu\text{m}$ umfassenden Schichten aufgenommen, wobei Anfang und Ende des z-Stapels vom Auftreten zellspezifischer Fluoreszenzsignale bestimmt waren. Durch die spezifische Anregung der verschiedenen Fluorophore mit einem Argon- bzw. Neonlaser konnte das Emissionssignal der durch immunfluoreszenzmarkierten Proteine in zwei unterschiedlichen Kanälen detektiert und in einer Bilddatei mit 16 Bit im Tiff-Format gespeichert werden. Die frei zugängliche Software ImageJ, welche auf der Programmiersprache Java basiert, ermöglichte es dann, die Bilder der einzelnen Schichten einer Zelle zusammen zu führen und die gesamte Information in einer Bilddatei zu speichern. Bei der weiteren Auswertung des Fluoreszenzsignals, ausgehend von markiertem β 1-Integrin und EGFP, wurden der Wachstumskegel einer Zelle sowie deren Zellkörper getrennt markiert und analysiert. Waren mehrere Wachstumskegel vorhanden, wurden diese in die Analyse miteinbezogen. Für die Bestimmung des Hintergrundsignals wurde neben der jeweiligen Zelle eine festgelegte quadratische Fläche auf etwaige Fluoreszenzsignale hin gemessen. Mithilfe der Programmoption „Histogramm“ von ImageJ wurde nun je Fluoreszenzkanal (Signal von β 1-Integrin und EGFP) der Grauwert eines jeden Pixels in den markierten Flächen bestimmt sowie die Häufigkeitsverteilung der Grauwerte in einer Ausgabematrix angegeben. Diese Matrix wurde in das Programm Excel (Microsoft Office 2000) kopiert, um die Summe aller Grauwerte, abzüglich des zugehörigen Hintergrundsignals, für Zellkörper und Wachstumskegel zu berechnen.

3.5.5 Statistische Analyse

Die gewonnenen Daten wurden mit einer multivariaten Varianzanalyse (ANOVA) statistisch ausgewertet. Ergab der Test der jeweiligen Zwischensubjekteffekte einen Unterschied zwischen den einzelnen Zwischensubjektfaktoren (Zelllinie und Beschichtung) von $p < 0,05$, wurde anschließend ein *Post-Hoc*-Test nach Fischer's Protected Least Significant Difference (PLSD) durchgeführt. Die statistischen Analysen wurden mittels der Software PASW Statistics durchgeführt.

3.6 Immunhistochemie und Histologie

3.6.1 Perfusion adulter Mäusen

Vor der Perfusion wurden die Tiere mit einem Gemisch aus dem Anästhetikum Ketanest S (Wirkstoff: Esketaminhydrochlorid, 15 mg/kg Körpergewicht) und dem Muskelrelaxans Rompun (Wirkstoff: Xylazinhydrochlorid, 0,5 %) über eine intraperitoneale Injektion betäubt. Vor jeder Perfusion wurde der Blutgerinnungshemmer Heparin-Natriumsulfat mit einem prozentualen Anteil von 0,2 % in den Tyrode-Puffer frisch dazugegeben. Durch das Anästhetikum fielen die Tiere in einen tiefen Schlaf. Die Betäubung wurde über den Augenblinkreflex sowie peripherer Schmerzempfindungen überprüft. Zeigte das Tier keine Reaktion auf diese, wurde es auf einer Korkmatte fixiert und mit einer Schere das Abdomen geöffnet, so dass die Leber frei lag. Anschließend wurden die Rippenbögen auf der linken und rechten Seite aufgeschnitten und das Zwerchfell durchtrennt. Mit einer Klemme wurde das Sternum am unteren Teil fixiert und so der Brustkorb geöffnet und das Herz freigelegt. Mit einer Ringpinzette wurde das noch schlagende Herz fixiert und eine Kanüle (26 G) in den linken Ventrikel platziert. Die Kanüle war mit einem Schlauch verbunden, dieser endete in einem Becherglas gefüllt mit gekühltem Tyrode-Puffer (siehe Tab. 3.29), welcher zunächst über eine Schlauchpumpe (Reglo Analog MS-2/8, Ismatec) mit einer sehr langsamen Flussgeschwindigkeit (ca. 5 ml/min) angesaugt wurde. Sofort im Anschluss wurde mit einem Schnitt der rechten Vorhof (Atrium) des Herzens geöffnet, so dass das Blut herausfließen konnte. Nun wurde die Flussgeschwindigkeit auf 10 ml/min hochgestellt. Wurde die aus dem Atrium austretende Flüssigkeit klar (nach ca. 50 ml), wurde der Schlauch in ein Becherglas überführt, welches mit PFA-Fixierlösung (siehe Tab. 3.29) gefüllt war. Das Gewebe wurde durch das Spülen mit ca. 100 ml Lösung fixiert und das Gehirn aus dem Schädel herauspräpariert. Für eine Nachfixierung wurde dieses über Nacht in PFA-Fixierlösung gelagert und am nächsten Tag zum Schneiden mit einem Kryostaten weiter behandelt (siehe Abs. 3.6.3).

Tabelle 3.29: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen

Tyrode-Puffer (500 ml, nicht autoklaviert)	PFA-Fixierlösung
4 g Natriumchlorid	4 % PFA (w/v)
0,1 g Kaliumchlorid	0,1 M PBS pH 7,4
0,05 g Magnesiumchlorid	
0,5 g Natriumhydrogencarbonat	
0,1 g Kalziumchlorid	
0,025 g Natriumdihydrogenphosphat	
0,5 g D-Glukose	
auf 500 ml mit ddH ₂ O auffüllen	

3.6.2 Herstellung PLL-beschichteter Objektträger

Mit einer sauren Alkohol-Lösung gereinigte Superfrost-Objektträger wurden in einer 0,01 % PLL-Lösung (siehe Tab. 3.30) 5 min lang beschichtet und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

Tabelle 3.30: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

Alkohol-Lösung	0,01 % PLL-Lösung
1 % HCL (v/v)	0,1 % PLL (w/v)
70 % Ethanol (v/v)	ddH ₂ O

3.6.3 Herstellung von Kryostatschnitten

Das für 24 h in einer 4 % PFA-Lösung nachfixierte Gehirn wurde zum Schutz vor Gefrierschäden in eine Saccharose-Lösung (siehe Tab. 3.31) überführt. Nachdem das Gehirn, aufgrund der Diffusion des Zuckers in die Zellen, auf den Boden des Glasgefäßes herabgesunken war, wurde dieses mit TissueTek O.C.T. Compund posterior auf ein Korkplättchen in -40°C kaltem 2-Methylbutan aufgefroren. Das gefrorene Gehirn wurde bei -20°C gelagert oder direkt im Anschluss, nach einer kurzen Temperaturadaptation an die Kammertemperatur von -20°C in dem CM 1950 Kryostaten (Leica Microsystems, Wetzlar, D) coronal auf einem Objektkopf fixiert (-18°C gekühlt) und in $30\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte zerteilt. Je nach Weiterbehandlung der Schnitte, wurden diese entweder direkt auf PLL-beschichteten Superfrost-Objektträgern aufgezogen oder in einer Natriumazid-Lösung (siehe Tab. 3.31) bei 4°C gelagert.

Tabelle 3.31: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

Saccharose-Lösung	Natriumazid-Lösung
30 % D-Saccharose (w/v)	0,02 % Natriumazid (w/v)
0,1 M PBS	0,1 M PBS

3.6.4 DAB-Färbung von Gewebeschnitten mittels der ABC-Methode

Bei der DAB-Färbung handelt es sich um ein enzymimmunochemisches Verfahren, bei welchem durch ein Markerenzym ein unlösliches farbiges Reaktionsprodukt dort präzipitiert wird, wo sich das nachzuweisende Antigen befindet. Ein solches Markerenzym ist die Meerrettich-Peroxidase (engl. horseradish peroxidase (HRP)). Durch die enzymatische Reaktion der HRP mit ihrem Substrat Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wird das gleichzeitig eingesetzte fast farblose Chromogen Diaminobenzidin (DAB) durch die freiwerdenden Protonen oxidiert und fällt als braunes Präzipitat aus. Die Meerrettich-Peroxidase selbst wird dabei nicht verbraucht und kann mehrere Reaktionen katalysieren. Es kommt somit zur Amplifikation, was einen entscheidenden Vorteil der enzymatischen Reaktionen gegenüber der Immunfluoreszenz darstellt. Des Weiteren wurde für diese Immunfärbung die ABC-Methode (ABC engl. Avidin-Biotin-Complex) verwendet, welche sich durch eine hohe Sensitivität auszeichnet. Sie basiert auf der Fähigkeit des Glykoproteins Avidin, nichtimmunologisch vier Moleküle des Vitamins Biotin zu binden, d.h. mithilfe eines Biotin-gekoppelten Sekundärantikörpers und einem Komplex aus Avidin-Biotin-konjugierter Meerrettichperoxidase wird somit die Detektion des Antigens verstärkt.

Die Schnitte wurden zunächst mit 0,3 % Wasserstoffperoxid und 5 % Methanol in PB-Puffer (siehe Tab. 3.32) für 10 min inkubiert. Dieser Schritt diente zur Inaktivierung endogener Peroxidasen im Gewebe. Nach dreimaligem Waschen in PB für jeweils 10 min wurden

die Schnitte für 2 h mit 10 % Serum und 10 % BSA in PB zum Blocken unspezifischer Antikörperbindungsstellen inkubiert. Das verwendete Serum stammte aus der gleichen Spezies aus welcher der Sekundärantikörper generiert wurde. Nun folgte die Inkubation des Primärantikörpers über zwei Nächte bei 4 °C in 2 % Serum und 2 % BSA in PB. Am dritten Tag wurde nicht gebundener Antikörper durch erneutes Waschen (s.o.) entfernt und die Schnitte mit dem Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper (1:250) in 2 % BSA/PB für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser richtete sich gegen Epitope der Tierspezies aus welcher der Primärantikörper stammte. Nach einem erneuten Waschschrift wurden nun die Schnitte mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Komplex musste 30 min vor seinem Einsatz aus den einzelnen Lösungen des Vectastain Elite ABC Kits angesetzt werden. Im Anschluss wurden die Schnitte erneut gewaschen und fünf Minuten lang mit einer DAB/PB-Lösung (0,5 mg/ml) präinkubiert bevor die Enzymreaktion der HRP durch die Zugabe von Wasserstoffperoxidlösung mit einer Endkonzentration von 0,006 % gestartet wurde. Die Schnitte zeigten bereits nach einer halben Minute braune Verfärbungen. Die Farbreaktion wurde je Antigen nach ca. 5-10 min mit PB abgestoppt und die Schnitte zum Schluss erneut gewaschen. Aufgezogen auf einen Objektträger und luftgetrocknet wurden die Schnitte mit Entellan eingedeckelt und lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 3.32: Zusammensetzung des verwendeten Puffers

0,1 M PB (pH 7,4)
0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat mit 0,2 M Natriumdihydrogenphosphat wurde der pH-Wert auf 7,4 titriert Arbeitslösung: Verdünnung 1:1

3.6.5 Fluoreszenzfärbung von Aktinfilamenten in Gewebeschnitten

Das Zytotoxin des Knollenblätterpilzes Phalloidin bindet an Aktinfilamente und verhindert so dessen Depolymerisation (Cooper, 1987). Das Aktinzytoskelett in einer Zelle kann somit über Fluoreszenzfarbstoffe, welche an Phalloidin gekoppelt sind sichtbar gemacht werden.

Die in der Natriumazid-Lösung gelagerten Schnitte wurden zunächst dreimal für 10 min mit PBS gewaschen. Für die Blockierung unspezifischer Bindungen wurden die Schnitte in 2 % BSA/PBST für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte mit 66 nM Alexa 488-gekoppeltes Phalloidin für eine Stunde in 2 % BSA/PBST bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Nach dreimaligen Waschen der Schnitte mit PBS (s.o.) wurden diese für eine Detektion der Zellkerne mit 600 nM DAPI/PBS 5 min lang behandelt. Es folgte erneutes Waschen und das Aufziehen der Schnitte auf Superfrost-Objektträgern. Nachdem die Schnitte getrocknet waren, wurden diese mit Mowiol-Eindeckmedium (siehe Tab. 3.33) und einem Deckgläschen eingedeckelt und bis zur mikroskopischen Auswertung lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

Tabelle 3.33: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen

PBST	Mowiol-Eindeckmedium:	
	Lösung 1	Lösung 2 (pH 7,4)
0,3 % TritonX (v/v)	20 g Mowiol 4-88	2,5 g Propylgallat
0,1 M PBS	80 ml 0,1 M PBS (pH 7,4)	50 ml PBS (pH 7,4)
	40 ml Glycerin	40 ml Glycerin
		2 mM Natriumazid
	7,5 ml Lösung 1 mit 2,5 ml Lösung 2 mischen	

3.6.6 Nissl-Färbung

Für die Bestimmung der genauen Lokalisation der Führungs- bzw. Injektionskanüle im Gehirn der wie in Abs. 3.2.2 beschriebenen operierten Tiere, wurde die von Franz Nissl entwickelte histologische Färbung verwendet. Bei dieser werden durch Anlagerung des in der Färbung verwendeten Kresylvioletts an basophile Verbindungen wie der DNA und der RNA die Zellkerne und die Ribosomen der Zellen angefärbt.

Die auf PLL-beschichtete Objektträgern aufgezogenen Schnitte wurden für eine Minute in einer Kresylviolettlösung gefärbt und anschließend in Acetatpuffer (siehe Tab. 3.34) gewaschen, bis eine spezifische Färbung zu beobachten war. Im Anschluss wurden die Schnitte für 5 min in 100 % Ethanol dehydriert und anschließend in Xylol 5 min lang gespült. Mit dem DMI 6000 Mikroskop (Leica-Microsystems) wurde die Lokalisation der Kanülen und die Qualität des Gewebes, welches die Injektionsstelle umrandete, überprüft.

Tabelle 3.34: Zusammensetzung des verwendeten Puffers bzw. der verwendeten Lösung

Acetatpuffer (pH 3,8 - 4,0)	Kresylviolettlösung
0,544 % Natriumacetat (w/v)	0,5 % Kresylviolett (w/v)
0,96 % Essigsäure (v/v)	Acetatpuffer

3.6.7 Black-Gold-Färbung

Mit der von Schmued und Slikker (1999) erstmalig beschriebenen Black-Gold-Färbemethode ist es möglich, myelinisierte Faserbündel im Zentralnervensystem anzufärben. Im Genaueeren färbt der Haloaurophosphatkomplex Black-Gold sowohl gesundes als auch pathologisches Myelin an.

Für diese Färbemethode wurden coronale Schnitte direkt beim Schneiden auf Gelatinebeschichtete Objektträger aufgezogen und luftgetrocknet. Rehydriert in ddH₂O wurden die Schnitte für 13 min in 65 °C warmer Black-Gold-Lösung (siehe Tab. 3.35) inkubiert. Im Anschluss wurde die Färbung alle 2-3 min überprüft. Hatten sich alle Faserbündel gut angefärbt, wurde die Reaktion durch Spülen mit ddH₂O für 2 min abgestoppt. Im Anschluss wurde die Färbung mit 1 % Natriumthiosulfat (w/v) für 3 min fixiert. Die Schnitte wurden dann erneut 15 min lang mit ddH₂O gespült, anschließend auf einer Heizplatte (Medite GmbH, Burgdorf, D) bei 50 °C getrocknet, für 2 min in Xylol aufgehellt und mit Entellan eingedeckelt.

Tabelle 3.35: Zusammensetzung der verwendeten Lösung

Black-Gold-Lösung
0,2 % Black-Gold II (w/v)
0,9 % Natriumchlorid (w/v)

3.6.8 Timm-Silbersulfid-Färbung

Die Silbersulfid-Färbung nach Timm (1958) ist eine Silberimprägnierung und dient zum Nachweis der stark zinkhaltigen synaptischen Vesikel in den Terminalien der Moosfasern im Hippokampus. Sie beruht auf der Eigenschaft von Silberionen sich mit den unedleren Zinkionen zu verbinden und so als dunkelbrauner bis schwarzer Niederschlag auszufallen. In dieser Arbeit wurde ein von Danscher und Zimmer (1978) modifiziertes Protokoll der Timm-Silbersulfid-Färbung verwendet. Bei dieser Färbemethode war zu beachten, dass bei der Herstellung der Objektträger, dem Aufziehen der Schnitte und bei der Färbung nur mit metallfreien Plastikgegenständen (Pinzetten etc.) bzw. metallfreier Glasware gearbeitet werden durfte.

3.6.8.1 Perfusion

Die Perfusion erfolgte wie im Abschnitt 3.6.1 zuvor beschrieben, lediglich die verwendeten Puffer unterschieden sich. Die Tiere wurden ebenfalls mit einem Gemisch aus dem Anästhetikum Ketanest S und dem Muskelrelaxans Rompun über eine intraperitoneale Injektion betäubt. Für die Perfusion von P15 alte Tiere wurde mit einer abgestumpften Kanüle (26 G) und mit einer geringeren Flussgeschwindigkeit der Lösungen (5 ml/min) gearbeitet, um eine Beschädigung des Hirngewebes durch einen zu hohen Druck zu vermeiden. Zum Spülen der Blutgefäße wurde anstelle des Tyrode-Puffers ein Sulfid-Puffer (siehe Tab. 3.36) verwendet, da die im Puffer enthaltenen Sulfidionen die Zinkionen im Gewebe präzipitieren. Nachdem die aus dem geöffneten Atrium austretende Flüssigkeit klar wurde (nach ca. 30 - 40 ml), wurde mit 200 ml Phosphat/Glutaraldehyd-Puffer (für P15 Tiere 50 - 100 ml) das Gewebe fixiert und zum Schluss das Blutgefäßsystem erneut mit Sulfid-Puffer gespült. Im Anschluss an die Perfusion wurde das Gehirn herauspräpariert, zum Schutz vor Gefrierschäden und zur Nachfixierung in eine Glukose/Glutaraldehyd-Lösung über Nacht inkubiert und am nächsten Tag mit einem Kryostaten horizontal geschnitten (siehe Abs. 3.6.8.4).

Tabelle 3.36: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen

0,2 M PB (pH 7,4)	Sulfid-Puffer
0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat mit 0,2 M Natriumdihydrogenphosphat wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt	0,15 M Natriumsulfid 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphat
Phosphat/Glutaraldehyd-Puffer	Glukose/Glutaraldehyd-Lösung
2 % Glutaraldehyd 0,2 M PB (pH 7,4)	20 % D-Glukose (w/v) 2 % Glutaraldehyd (v/v)

3.6.8.2 Herstellung metallfreier Glasware

Objektträger ohne Mattrand sowie Glasküvetten wurden eine Stunde lang in Chromschwefelsäure (92 % Schwefelsäure, Anteil Chrom 1,3 %) eingetaucht und anschließend mit ddH₂O gespült. Gereinigte Glasware dürfte im Anschluss nicht mehr in Kontakt mit metallischen Gegenständen kommen, da bereits geringe Mengen an Metallverunreinigungen zu unspezifischen Silberpräzipitaten während der Timm-Silbersulfid-Färbung führen.

3.6.8.3 Herstellung Chrom-Kalium-Gelatine beschichteter Objektträgern

Metallfreie Objektträger wurden bei Raumtemperatur mit einer Gelatine-Lösung (siehe Tab. 3.37) beschichtet und über Nacht in einem Wärmeschrank (Binder GmbH, Tuttlingen, D) bei 40 °C getrocknet.

Tabelle 3.37: Zusammensetzung der verwendeten Lösung

Gelatinelösung
0,5 % Gelatine (w/v)
0,05 % Chromalaun (w/v)
ddH ₂ O

3.6.8.4 Herstellung von Kryostatschnitten

Am Tag nach der Perfusion wurde das Gehirn auf Trockeneis angefroren und anschließend mit der Schnellfrostfunktion (−50 °C) des Kryostaten horizontal auf den Objektkopf aufgefroren. Bei einer Kammertemperatur von 20 °C (Objektkopf −18 °C) wurde beginnend in der midseptotemporalen Ebene bis hin zum Ende des ventralen Hippokampuses zwei Schnittserien mit einer Schnittdicke von 40 μm angefertigt. Die Schnitte wurden auf Gelatine-beschichtete metallfreie Objektträger aufgezogen, auf einer Heizplatte (Meditate GmbH) getrocknet und bis zur Färbung (max. 3 Monate) bei 4 °C trocken gelagert.

3.6.8.5 Timm-Silbersulfid-Färbung

Die aufgezogenen horizontalen Gewebeschnitte wurden in einer Timm-Färbelösung (siehe Tab. 3.38) bei 25–30 °C lichtgeschützt in einem Wärmeschrank (Binder GmbH) angefärbt. Die Reaktion der Silberionen mit den Zinkionen beginnt nach ca. 30 min Inkubation. Zeigten die Schnitte eine spezifische Silberfärbung so wurde die Färbung durch Spülen der Schnitte mit dH₂O für 10 min abgestoppt und für 5 min mit 1 % Natriumthiosulfat (w/v) fixiert. Nach zweimaligem kurzen Spülen mit ddH₂O wurden die Zellkerne mit 3 % Methylblau (w/v) für 10 s angefärbt. Nun folgte ein Entwässern der Schnitte erst kurz in 70 % Ethanol (v/v), dann für jeweils für 5 min in 95 % Ethanol (w/v), zweimal in 100 % Ethanol und zum Schluss zweimal in Xylol. Die Schnitte wurden mit Entellan und einen Deckgläschen beschichtet und lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 3.38: Zusammensetzung der verwendeten Lösung

Timm-Färbelösung
80 ml ddH ₂ O
5,1 g Zitronesäure
4,7 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat
3,4 g Hydrochinon
120 ml 50 % Gummi Arabicum (w/v, versetzt mit ca. 0,02 % Thymol (w/v, Fungizid))
0,17 g Silbernitrat (frisch dazu geben, gelöst in 1 ml ddH ₂ O)

3.6.8.6 Auswertung

Mit dem Zeiss-Mikroskop AxioImager Z1 und der Software AxioVision wurde der ventrale Hippokampus aller Timm-gefärbten Schnitte mit einer fünffachen Vergrößerung aufgenommen. Die Bilddateien wurden im JPEG-Format exportiert und im Anschluss mit dem QWin-Programm die Fläche der Faserendigungen des intra-infrapyramidalen bzw. des suprapyramidalen Moosfaserbündels der hippokampalen Körnerzellen ermittelt. Hierfür wandelte das Programm die RGB-Farbkodierung des Bildes in Grauwertstufen um und ermittelte den jeweiligen Grauwert eines Pixels. Dunkle Bereiche wie beispielsweise die Timm-gefärbten Moosfaserendigungen wurden so durch das Programm erkannt und hervorgehoben, während helle, kontrastarme Bereiche von dem Programm nicht in die Auswertung einbezogen wurden. Daraufhin konnte die Fläche der Axonterminalen des suprapyramidalen sowie des intra-infrapyramidalen Faserbündels durch manuelles Umranden in separate ROIs (engl. region of interest) unterteilt werden, woraufhin das Programm nun automatisch die Pixeldichte der markierten Flächen ermittelt hat. Die Daten wurden in eine Exceloberfläche kopiert und dort weiter analysiert.

3.6.8.7 Statistische Analyse

Die ermittelten Daten wurden mit einer univariaten Varianzanalyse (ANOVA) in dem Programm PASW Statistics statistisch ausgewertet. Ergab der Test der Zwischensubjektffekte einen Unterschied innerhalb des Zwischensubjektffaktors (Genotyp) von $p < 0,05$, wurde anschließend ein *Post-Hoc*-Test nach Fischer's Protected Least Significant Difference (PLSD) durchgeführt.

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Die Bedeutung der Serin/Threonin-Kinase Ndr2 für die neuronale Differenzierung von PC12-Zellen und hippokampalen Primärneuronen

4.1.1 Ndr2 reguliert abhängig von dem Zelladhäsionsmolekül Integrin das Auswachsen der Neuriten von PC12-Zellen

4.1.1.1 Eine Überexpression von Ndr2 verhindert in PC12-Zellen das über $\alpha1\beta1$ -Integine vermittelte Neuritenwachstum

In vorangegangenen Experimenten (siehe Kapitel Einleitung Abs. 1.1.3) untersuchte ich bereits den Einfluss der Serin/Threonin-Kinase Ndr2 auf die neuronale Differenzierung in PC12-Zellen. So zeigte sich, dass Ndr2 abhängig von verschiedenen Bestandteilen der extrazellulären Matrix das Neuritenlängenwachstum von PC12-Zellen reguliert. Hierbei erhöhte die Ndr2-Kinase abhängig von ihrer Kinaseaktivität, aber unabhängig von einer Zell-Matrix-Adhäsion das Auswachsen von Neuriten. Hingegen inhibierte Ndr2 das Neuritenwachstum von PC12-Zellen auf Kollagen IV.

Aufgrund dieser Beobachtung überprüfte ich in den folgenden Experimenten durch eine Beeinflussung der Integrin-Liganden-Bindung die Hypothese eines Einflusses der Serin/Threonin-Kinase Ndr2 auf das Integrin-vermittelte Neuritenlängenwachstum. Zu diesem Zweck wurde mithilfe des Disintegrins Obtustatin spezifisch die Bindung von $\alpha1\beta1$ -Integrinen der sich differenzierenden PC12-Zellen an Kollagen IV blockiert (Brown et al., 2009). In einem weiteren Experiment wurde durch eine Anhebung der Konzentration an Magnesiumionen im Medium indessen unspezifisch die Bindungsaffinität aller Integrin-Dimere zu ihren Liganden erhöht (Gotwals et al., 1999). Des Weiteren verwendete ich wie schon in den vorangegangenen Versuchen zum einen die stabil-transfizierte PC12-Zelllinie EGFP-Ndr2, welche eine native Form von Ndr2 exprimiert und zum anderen die Linie EGFP-Ndr2 Mutante, die eine mutierte Form von Ndr2 exprimiert. Diese Form von Ndr2, in der die beiden Phosphorylierungsstellen Serin²⁸¹ und Threonin⁴² nach einem Basenaustausch mutiert vorlagen, vermittelte somit eine mögliche Funktion einer phosphorylierungsinaktiven Ndr2-Kinase.

Eine univariate Varianzanalyse des Neuritenlängenwachstums transfizierter PC12-Zellen (Zellen mit Neuriten $> 100 \mu\text{m}$) zeigte eine signifikante Interaktion ($F_{4,54} = 12,268; p <$

0,001) innerhalb der Zwischenssubjektfaktoren Zelllinie (EGFP, EGFP-Ndr2, EGFP-Ndr2 Mutante), Substrat (PDL gegen Kollagen IV) und Behandlung (NGF, NGF mit Obtustatin, NGF mit Magnesiumchlorid). Eine Betrachtung der Daten erhoben für das Neuritenlängenwachstum der Kontrollzellen (EGFP) bzw. von Zellen, welche einmal mit der nativen Form sowie einer mutierten Form von Ndr2 transfiziert wurden, zeigten sehr unterschiedliche Auswirkungen innerhalb der drei Behandlungsgruppen. Aufgrund dessen wird in den folgenden Abschnitten detaillierter die Bedeutung der unterschiedlichen Behandlungen für die Differenzierung der drei Zelllinien analysiert.

So bestätigte sich für die Kontrollzelllinie EGFP (Abb. 4.1 A) die schon in vorangegangenen Experimenten von mir beobachtete (siehe Kapitel Einleitung Abb. 1.4) Erhöhung des Neuritenlängenwachstums auf Kollagen IV im Vergleich zu PDL (NGF/PDL: $1 \pm 0,6$; NGF/Kollagen IV: $10,7 \pm 1,4$; Fischer's PLSD $p = 0,003$). Die statistische Analyse erwies weiterhin, dass diese Zunahme durch eine Behandlung dieser Zellen mit Magnesiumchlorid ($p = 0,025$) sowie durch Obtustatin ($p = 0,003$) verstärkt werden konnte (NGF: $10,7 \pm 1,4$; NGF mit Magnesiumchlorid: 15 ± 1 ; NGF mit Obtustatin: $17,7 \pm 0,3$). Interessanterweise konnte durch die Behandlung von Zellen der Linie EGFP mit Obtustatin eine Induktion des Neuritenlängenwachstums auf PDL zu Werten ähnlich derer auf Kollagen IV beobachtet werden (PDL: $17 \pm 0,6$; Kollagen IV: $17,7 \pm 0,3$; $p = 0,374$ n.s.).

Für Zellen der Linie EGFP-Ndr2 (Abb. 4.1 B) zeigte sich im Vergleich zu PDL sowie zu der Kontrollzelllinie EGFP (Fischer's PLSD, $p = 0,001$) zunächst keine erhöhte Induktion des Neuritenlängenwachstums auf Kollagen IV unter Kontrollbedingungen (NGF/PDL: $2,3 \pm 0,3$; NGF/Kollagen IV: $2,3 \pm 0,9$; NGF/Kollagen IV/EGFP: $10,7 \pm 1,4$). Dieser Effekt konnte auch durch eine Behandlung dieser Zellen mit Obtustatin (PDL: $2,3 \pm 1,4$; Kollagen IV: $1 \pm 0,6$; Vergleich zu EGFP: $p < 0,001$) nicht aufgehoben werden. Hingegen bewirkte eine Behandlung mit Magnesiumchlorid eine Zunahme der Anzahl an Zellen mit Neuriten über $100 \mu\text{m}$ Länge auf PDL ($7,3 \pm 0,3$; Vergleich zu NGF: $p = 0,007$) sowie auf Kollagen IV (6 ± 1 ; Vergleich zu NGF: $p = 0,021$). Diese Induktion war für Zellen der Linie EGFP-Ndr2 auf beiden Substraten gleich ($F_{1,9} = 1,600$; $p = 0,275$ n.s.). Im Vergleich mit der Kontrollzelllinie EGFP zeigte sich nur die für PDL beobachtete Induktion signifikant erhöht ($p = 0,000$), wohingegen für Kollagen IV keine Steigerung gegenüber der Linie EGFP ermittelt werden konnte ($p = 0,001$).

Die Betrachtung des Neuritenlängenwachstums für Zellen der Linie EGFP-Ndr2 Mutante (Abb. 4.1 C) zeigt eine leichte, aber signifikante Erhöhung auf Kollagen IV im Vergleich zu PDL unter Kontrollbedingungen (NGF/PDL: $0,3 \pm 0,3$; NGF/Kollagen IV: $4 \pm 0,6$; $p = 0,005$). Diese Induktion war aber schwächer als die in der Kontrollzelllinie EGFP ($p = 0,004$). Auch unterschied sich das Neuritenwachstum auf Kollagen IV nicht signifikant von dem der Zelllinie EGFP-Ndr2 ($p = 0,299$). Andererseits ähnelte das Neuritenwachstum von EGFP-Ndr2 Mutante auf PDL eher dem der Kontrollzelllinie mit einer gegenüber EGFP-Ndr2-transfizierten Zellen signifikant reduzierten Zahl an Zellen mit über $100 \mu\text{m}$ langen Neuriten (EGFP-Ndr2 Mutante: $0,3 \pm 0,3$; EGFP-Ndr2: $2,3 \pm 0,3$; $p = 0,017$). Hingegen zeigten diese Zellen, ähnlich wie EGFP-Ndr2-transfizierte Zellen keine Erhöhung des Neuritenlängenwachstums durch Obtustatin auf PDL oder Kollagen IV (PDL: $1,3 \pm 0,3$; Kollagen IV: $4,3 \pm 1,3$; Vergleich zu EGFP: $p < 0,001$). Zudem wurde das Wachstums der Neuriten durch eine Behandlung mit Magnesiumchlorid auf PDL ($2,3 \pm 0,3$; Vergleich zu NGF: $p = 0,000$) nur wenig erhöht. Jedoch zeigten Zellen der Linie EGFP-Ndr2 Mutante, induziert durch eine erhöhte Konzentration an Magnesiumionen im Medium,

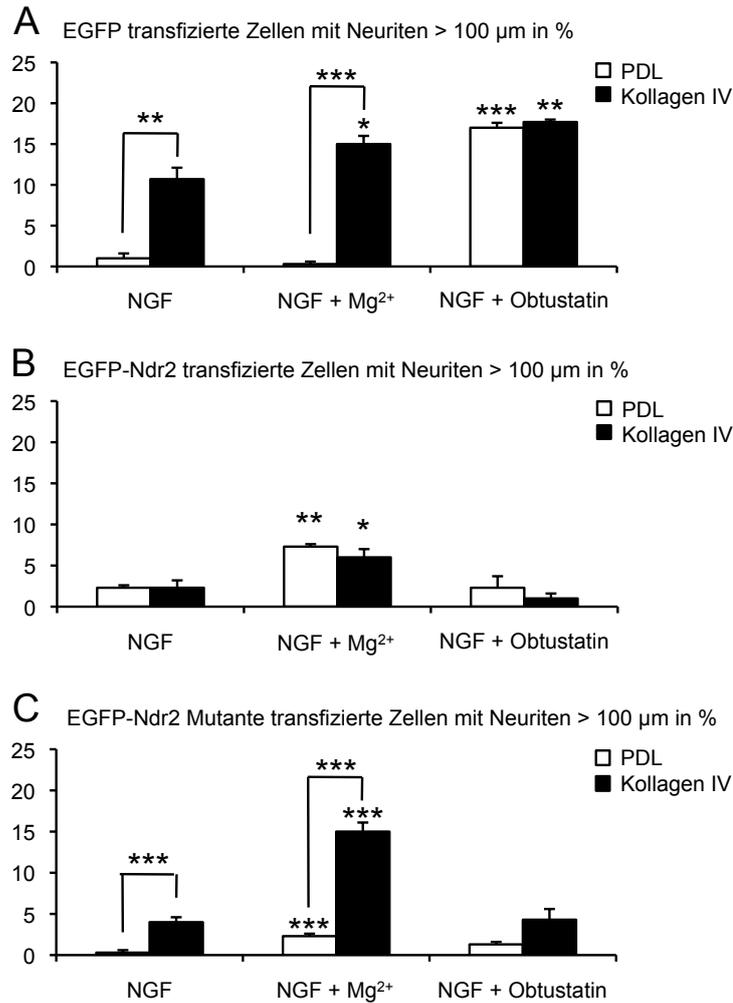


Abbildung 4.1: Morphologische Analyse stabil-transfizierter PC12-Zellen

A PC12-Zellen der Linie EGFP zeigten auf Kollagen IV im Vergleich zu PDL eine Erhöhung des Neuritenlängenwachstums. Diese konnte durch eine Zugabe von Magnesiumionen in das Medium gesteigert werden. Interessanterweise führte eine Behandlung mit dem Disintegrin Obtustatin sowohl auf Kollagen IV als auch auf PDL zu einer ähnlich erhöhten Induktion des Neuritenwachstums von Kontrollzellen. **B** PC12-Zellen der Linie EGFP-Ndr2 zeigten im Vergleich zu PDL und der Kontrollzelllinie EGFP keine erhöhte Induktion des Wachstums von Neuriten auf Kollagen IV. Eine Behandlung der Zellen mit Obtustatin hatte ebenfalls keinen Einfluss auf das Neuritenwachstum. Lediglich eine Erhöhung der Magnesiumionenkonzentration im Medium führte zu einer geringen Zunahme der Anzahl an Zellen, die Neuriten mit einer Länge über 100 μm ausbildeten. Dies konnte aber auf den beiden Substraten PDL und Kollagen IV beobachtet werden. **C** Für Zellen der Linie EGFP-Ndr2 Mutante konnte hingegen eine leichte Erhöhung des Neuritenwachstums auf Kollagen IV im Vergleich zu PDL beobachtet werden. Doch ähnlich wie EGFP-Ndr2 zeigte diese Linie eine Zunahme der Zahl an Zellen mit über 100 μm langen Neuriten auf PDL sowie auf Kollagen IV nur durch eine Behandlung mit Magnesiumchlorid nicht aber mit Obtustatin.

Die Werte sind dargestellt als MW \pm SFM. Für die jeweilige Behandlung (NGF, NGF mit Obtustatin und NGF mit Magnesiumchlorid) der Zellen auf den beiden Substraten (PDL und Kollagen IV) wurde pro Linie (EGFP, EGFP-Ndr2 und EGFP-Ndr2 Mutante) 15 Bilder ausgewertet. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ im Vergleich zu NGF oder PDL

eine Zunahme der Zahl an Zellen mit über $100\ \mu\text{m}$ langen Neuriten auf Kollagen IV (Kollagen IV: $15 \pm 1,1$; Vergleich zu NGF: $p = 0,000$; Vergleich PDL und Kollagen IV: $p = 0,000$). Diese Induktion war ähnlich derer, wie sie für Zellen der Linie EGFP beobachtet wurde ($p = 1,000$ n.s.).

4.1.2 Ndr2 reguliert abhängig von einer Integrin-vermittelten Zelladhäsion die dendritische Verzweigung hippokampaler Primärneuronen

4.1.2.1 Ndr2 wird in Dendriten exprimiert

Um eine mögliche Bedeutung der Aktivität von Ndr2 während der Verzweigung von Neuriten hippokampaler Primärneuronen zu bestimmen, untersuchte ich zunächst die Expression und die intrazelluläre Verteilung der Kinase in diesen Zellen. Wie anhand der repräsentativen mikroskopischen Darstellung in der Abbildung 4.2 zu erkennen ist, wurde Ndr2 prominent in den kultivierten Neuronen exprimiert und zeigte dabei einen hohen Grad an einer Kolo-kalisation mit dem mikrotubuliassoziierten Protein Map2a und Map2b, das nur in den Dendriten exprimiert wurde. Anhand der vergrößerten Darstellung eines Dendriten lässt sich zudem gut erkennen, dass Ndr2 eine punktierte Verteilung in diesen Fortsätzen aufwies.

4.1.2.2 Morphologische Grundcharakterisierung differenzierender Primärneurone

Für die Untersuchung einer möglichen Bedeutung der Serin/Threonin-Kinase Ndr2 für die Verzweigung von Dendriten verwendete ich die von Sholl (1953) beschriebene Methode zur Bestimmung des Verzweigungsgrades eines Dendritenbaumes. Als Vorarbeit hierfür war es nötig zu klären, wie die Dendriten und das Axon der Neurone in den zu untersuchenden Präparaten sich morphologisch sicher differenzieren ließen.

Zu diesem Zweck wurden an DIV3 hippokampale Primärkulturen mit dem pEGFP-C1 Vektor transfiziert. Das kleine fluoreszierende Protein EGFP diente als Volumenindikator, da es sich aufgrund seines Molekulargewichtes und seiner Struktur im Zytosol der ganzen Zelle einschließlich der Neuriten verteilte (Tsien, 1998). Nach sieben Tagen in Kultur wurden die Dendriten bzw. Axone der Neurone immunzytochemisch mit einem Antikörper gegen Map2a und Map2b bzw. gegen Gap-43 markiert. Gap-43 (growth associated protein 43) ist ein membranassoziertes Protein, welches in axonalen Fasern und besonders stark angereichert in den Wachstumskegeln von Axonen vorkommt (Goslin and Banker, 1990). Mit diesen beiden Markern konnten die Neuriten einer EGFP-transfizierten Zelle entweder als Dendrit oder als Axon eindeutig identifiziert werden. Dabei zeigten die unterschiedlichen Färbungen (siehe Beispielzelle in der Abb. 4.3), dass die von mir untersuchten Primärneurone *in vitro* viele im Durchmesser dicke und stark verzweigte Dendriten (C und G) und ein langes, im Durchmesser sehr dünnes und schwach verzweigtes Axon (B und F) ausbildeten. Diese Beobachtungen betätigen die zuvor von Crino und Eberwine 1996 für hippokampale Rattenneurone in Kultur beschriebenen morphologischen Unterschiede von Dendriten und Axonen.

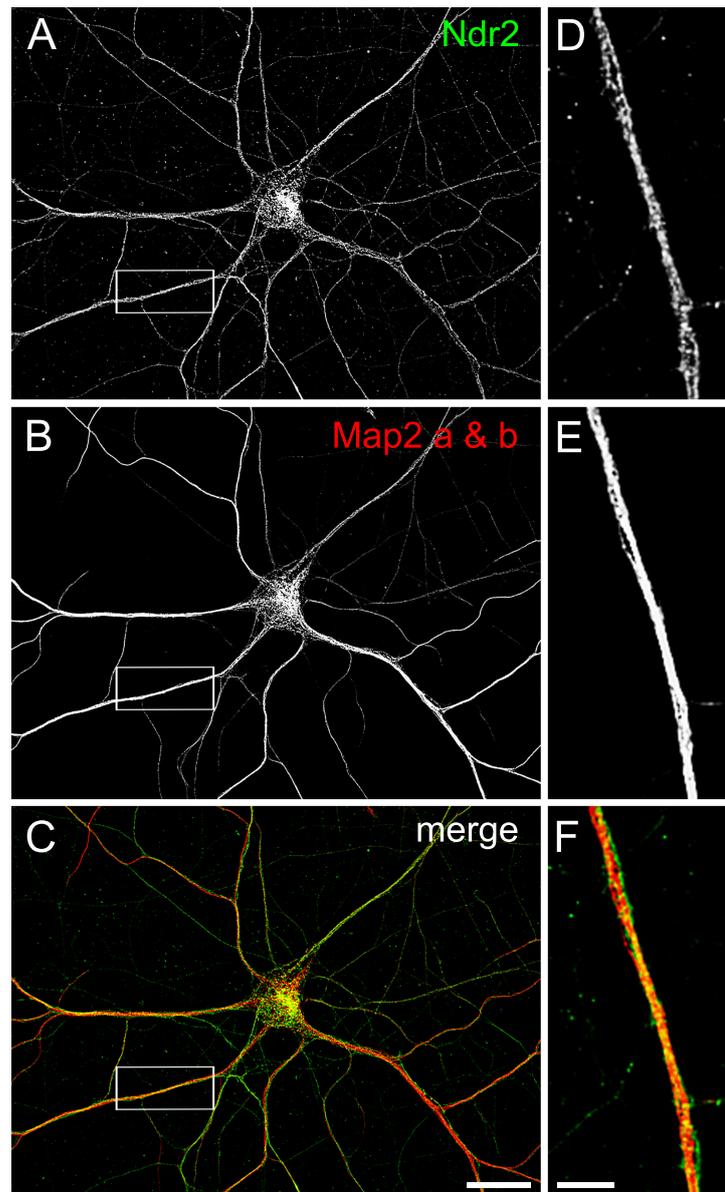


Abbildung 4.2: Immunfluoreszenzfärbung hippocampaler Primärneurone (DIV14)

Eine Zweifachimmunfluoreszenzfärbung der Serin/Threonin-Kinase Ndr2 (A) und der nur in Dendriten exprimierten Isoformen Map2a und Map2b zeigte (B), dass in hippocampalen Primärneuronen beide Proteine in hoher Masse kolokalisierten (C). Ndr2 lag dabei neben den Somata stark angereichert in den Dendriten (D, E & F) vor. Maßstab: A - C 25 μm ; D - F 5 μm

Aufgrund der Anzahl, des Verzweigungsgrades und des Durchmessers der Dendriten gegenüber dem einen Axon einer jeden Zelle konnte ich also in der folgenden Auswertung der Sholl-Analyse davon ausgehen, dass es sich bei der Anzahl der Schnittpunkte mit den konzentrischen Kreisen um den Grad der dendritischen Verzweigung handelte.

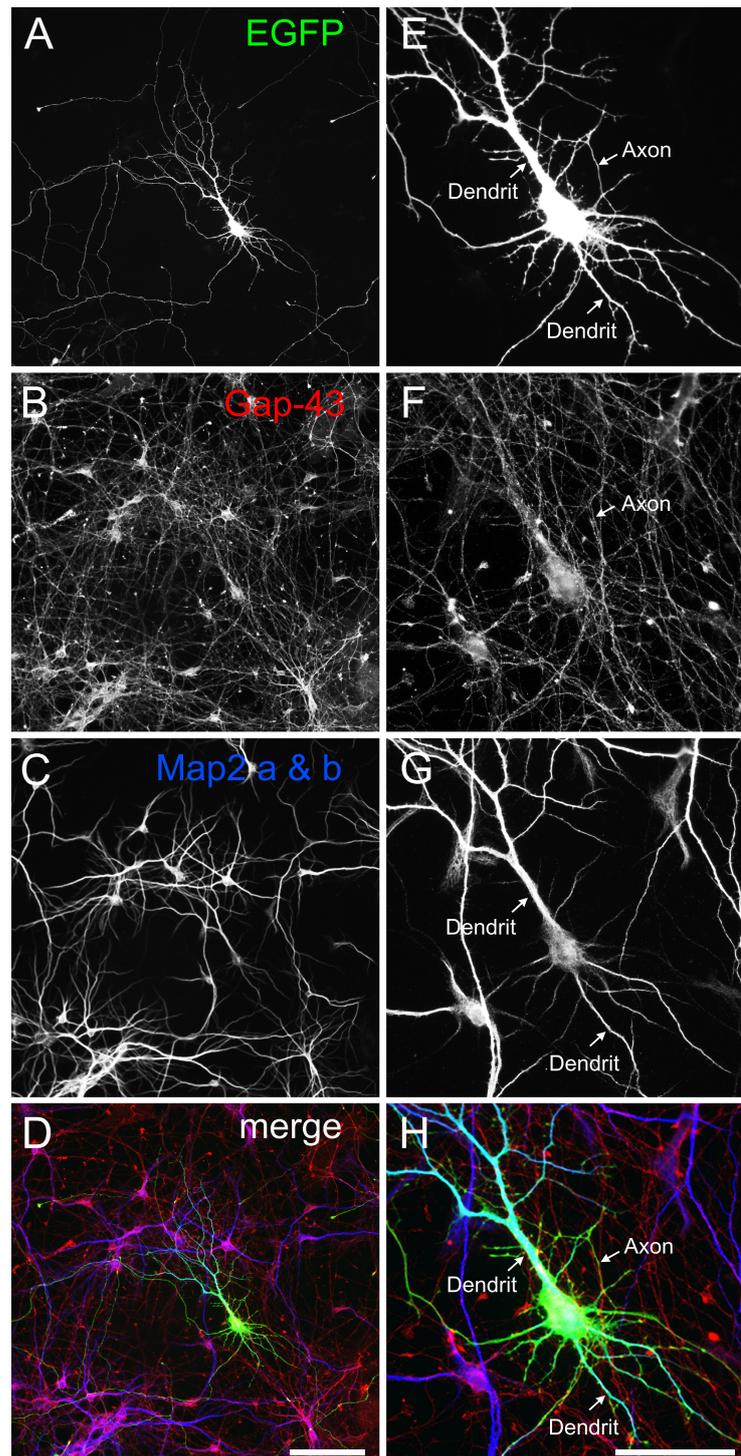


Abbildung 4.3: Immunfluoreszenzfärbung transgenerierter hippocampaler Primärneurone (DIV7)

Anhand des EGFP-Signals (A & E) eines transgenierten Primärneurons und des Immunfluoreszenzsignals des Axonenmarkerproteins Gap-43 (B & F) und der Dendritenmarkerproteine Map2a und Map2b (C & G), konnten das einzelne Axon und die vielen vom Soma abgehenden Dendriten des Neurons durch eine Überlagerung der Signale (D & H) identifiziert werden. Dabei ist zu bemerken, dass die Dendriten mit ihrem Durchmesser und in ihrem Verzweigungsgrad sich von dem dünnen und wenig verzweigten Axon stark abhoben. Maßstab: A - D 100 μm ; E - H 50 μm

4.1.2.3 Eine Manipulation der Ndr2-Expression beeinflusst die dendritische Verzweigung hippokampaler Primärneurone

Nun konnte mithilfe der Sholl-Analyse der Einfluss der Serin/Threonin-Kinase Ndr2 auf die Dendritenbaumverzweigung der Neurone untersucht werden. Der Zeitpunkt DIV7 wurde für die Untersuchung gewählt, da hier die Neuritenbildung als abgeschlossen gilt und eine Reifung der Fortsätze beginnt (Goslin and Banker, 1990). Zur Manipulation der Expression von Ndr2 wurde einerseits die Kinase als Fusionsprotein mit dem Fluoreszenzfarbstoff mCherry überexprimiert und andererseits mithilfe einer für die Ndr2-mRNA spezifischen shRNA massiv reduziert. Die Wirksamkeit der shRNAs shNdr2 und shKontrolle (sequenzspezifisch für die mRNA des Enzyms Luciferase) wurde in Vorversuchen bestätigt.

Eine statistische Auswertung der gewonnenen Daten mit einer Varianzanalyse für wiederholte Messungen zeigte einen generellen Effekt ($F_{3,106} = 18,823$; $p = 0,000$) auf die Verzweigung der Dendriten von Neuronen, die entweder mCherry-Ndr2 und EGFP oder EGFP allein, bzw. shNdr2 und EGFP oder shKontrolle und EGFP exprimierten. Eine genauere Betrachtung der Anzahl der Schnittpunkte der Dendriten mit den konzentrischen Kreisen der Scholl-Analyse zeigte ihre signifikante Abhängigkeit von der Distanz ($F_{58,6148} = 38,485$; $p = 0,000$), mit welcher diese vom Soma ausgehend um die Zelle gelegt wurden. Weiterhin konnte eine Interaktion zwischen der Distanz und den unterschiedlichen Transfektionsgruppen (mCherry-Ndr2/EGFP, EGFP, shNdr2/EGFP, shKontrolle/EGFP) beobachtet werden ($F_{174,6148} = 2,499$; $p = 0,000$). Es zeigt sich, dass eine Überexpression von Ndr2 (Abb. 4.4 bzw. Abb. 4.5 A) eine starke Erhöhung der Verzweigung der Dendriten induzierte ($F_{1,68} = 14,604$; $p = 0,000$), wohingegen eine Blockierung der Expression endogener Ndr2-Kinasen (Abb. 4.4 und Abb. 4.5 B) zu einer Reduktion der Verzweigung der Dendriten führte ($F_{1,38} = 32,981$; $p = 0,000$).

Ein Vergleich der Anzahl an nahen (proximal: 20 – 60 μm , A) und vom Soma der Zellen weiter entfernt (distal: 300 – 400 μm , B) gelegenen Schnittpunkten belegte, dass eine Überexpression von Ndr2 die Verzweigung des distalen Dendritenbaumes signifikant erhöhte (mCherry-Ndr2/EGFP: $14,91 \pm 0,20$; EGFP: $8,50 \pm 0,40$; Fischer's PLSD, $p = 0,000$), wohingegen im proximalen Bereich kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe zu beobachten war (mCherry-Ndr2/EGFP: $16,39 \pm 1,16$; EGFP: $16,45 \pm 0,70$; $p = 0,960$ n.s.). Die Blockierung der Expression von Ndr2 mittels einer sequenzspezifischen shRNA führte hingegen zu einer Inhibierung der Verzweigung (Abb. 4.6 A und B), sowohl im proximalen (shNdr2/EGFP: $9,41 \pm 0,34$; shKontrolle/EGFP: $14,67 \pm 0,87$; $p = 0,003$) als auch im distalen (shNdr2/EGFP: $4,47 \pm 0,57$; shKontrolle/EGFP: $8,01 \pm 0,75$; $p = 0,001$) Bereich des Dendritenbaumes. Zu erwähnen ist, dass Neurone, welche mit der KontrollshRNA transfiziert wurden (Abb. 4.6 A und B), keinen Unterschied in ihrer Verzweigung gegenüber EGFP-transfizierten Neurone zeigten ($F_{1,53} = 0,030$; $p = 0,684$).

4.1.2.4 Echistatin blockiert die durch eine Überexpression von Ndr2 induzierte Erhöhung der dendritischen Verzweigung

Mit mithilfe des RGD-Disintegrins Echistatin untersuchte ich inwieweit die beobachtete Erhöhung der Verzweigung der Dendriten bei einer Überexpression von Ndr2 abhängig von der Integrin-vermittelten Zelladhäsion war. Echistatin bindet spezifisch an die in hippokampalen Neuronen reich exprimierten $\alpha 5\beta 1$ -, $\alpha v\beta 3$ - und $\alpha v\beta 1$ -Integrine und inhibiert infolgedessen die durch sie vermittelte Zell-Matrix-Adhäsion (Williams, 1992).

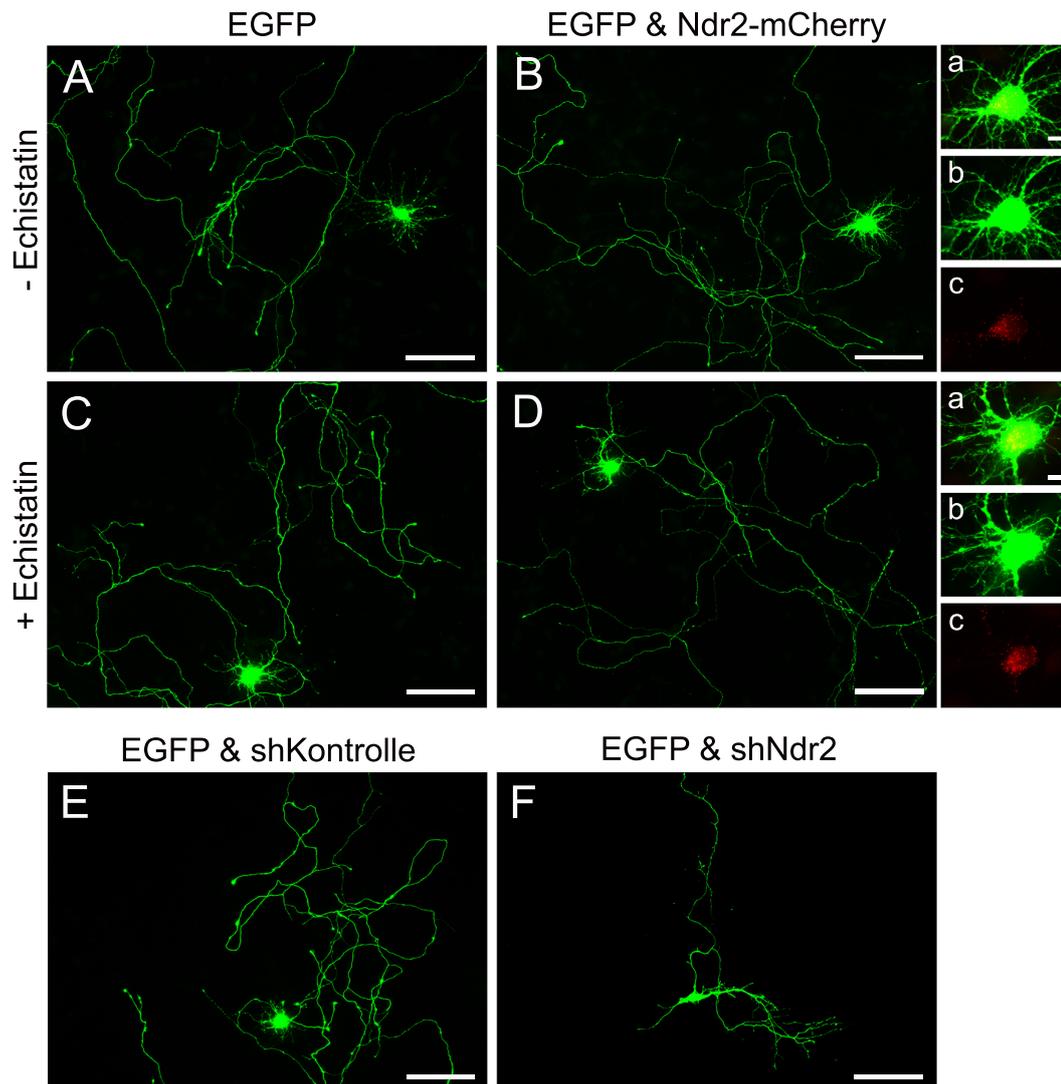


Abbildung 4.4: Mikroskopische Aufnahme des Fluoreszenzsignals transfizierter hippocampaler Primärneurone (DIV7)

Anhand des Fluoreszenzsignals von EGFP konnte die Morphologie hippocampaler Primärneurone analysiert werden. Es ist deutlich zu erkennen, dass mCherry-Ndr2 kotransfizierte Neurone einen erhöhten Verzweigungsgrad der Dendriten (B) gegenüber Kontrollneuronen (A) aufwiesen. Eine Behandlung mit dem Disintegrin Echistatin hingegen blockierte den steigernden Effekt einer Überexpression von Ndr2 auf die Differenzierung der Neurone (C und D). Indes führte eine Inhibierung der endogenen Expression von Ndr2 deutlich sichtbar (F) zu einer Reduzierung der dendritischen Verzweigung hippocampaler Primärneurone. Die Kontroll-shRNA hatte keinen Einfluss auf die Morphologie der Neurone (E). Zu bemerken ist, dass mCherry-Ndr2 in den Neuronen eine punktierte Verteilung aufwies (c). Maßstab: A-F 100 μm ; a-c 5 μm

Eine multivariate Varianzanalyse für wiederholte Messungen zeigte eine generelle signifikante Interaktion ($F_{1,136} = 13,727$; $p = 0,000$) zwischen der Transfektion mit EGFP oder mit mCherry-Ndr2 und EGFP einerseits und der Behandlung der Zellen mit Echistatin andererseits. Weiterhin konnte eine signifikante Abhängigkeit des Dendritenwachstums von der Distanz vom Soma ($F_{58,7888} = 48,575$; $p = 0,000$) sowie dessen Interaktion mit

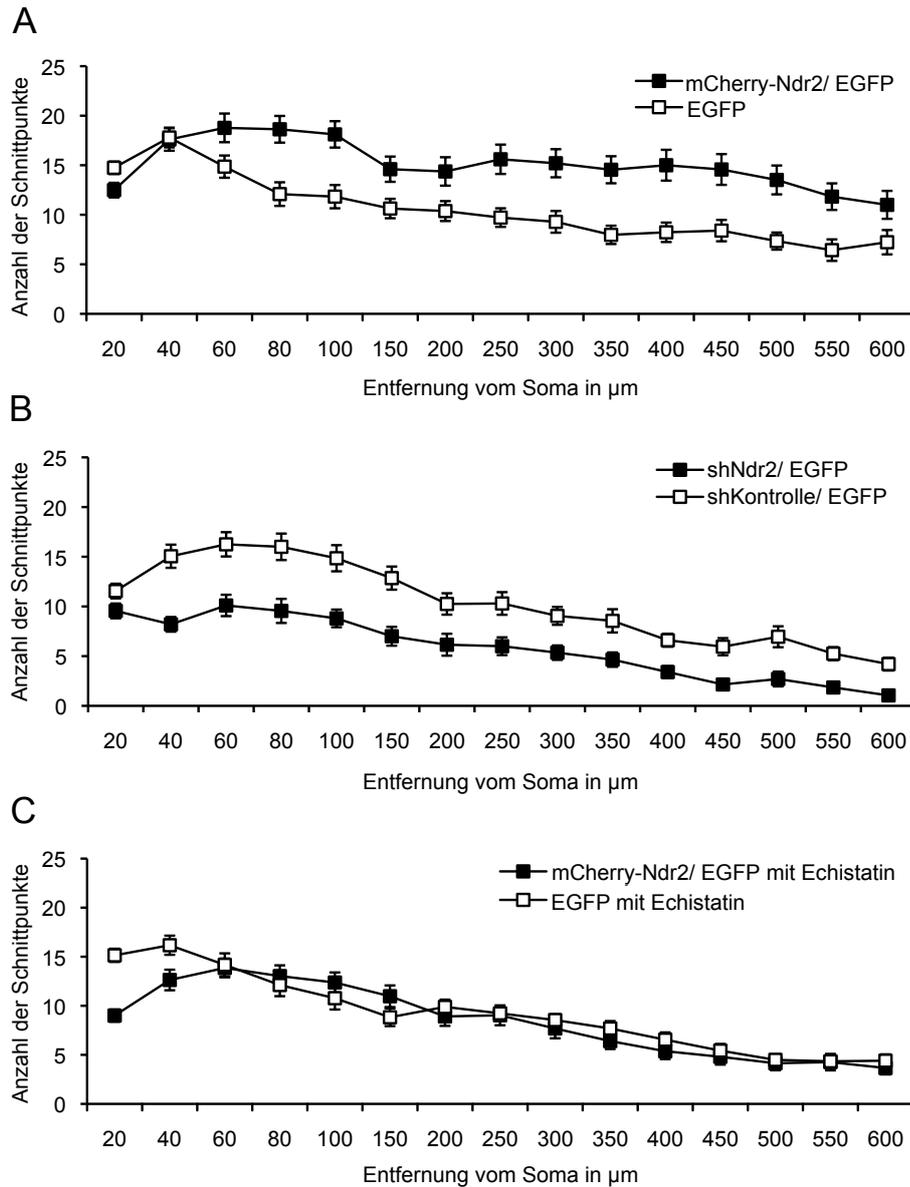


Abbildung 4.5: Quantitative Analyse des dendritischen Wachstums

Mithilfe einer Sholl-Analyse wurde die Verzweigung der Dendriten zum Zeitpunkt DIV7 untersucht. **A** Dabei zeigten mit EGFP/mCherry-Ndr2 transfizierte Neurone ($n = 35$) eine starke Zunahme der Verzweigung im Vergleich zu EGFP-exprimierenden Kontrollzellen ($n = 35$). **B** Die Blockierung der Expression der endogenen Ndr2-Kinase führte indes zu einer Verminderung der Dendritenverzweigung (EGFP/shNdr2: $n = 20$, EGFP/shKontrolle: $n = 20$). **C** Interessanterweise induzierte eine Inhibierung der über RGD-spezifische Integrine vermittelten Zell-Matrix-Adhäsion durch Echistatin eine vollständige Blockierung der Ndr2-vermittelten Zunahme der dendritischen Verzweigung, wohingegen das Disintegrin die Differenzierung der Dendriten von EGFP-transfizierten Neurone nicht beeinflusste (EGFP/mCherry-Ndr2: $n = 35$, EGFP: $n = 35$). Die Werte sind dargestellt als MW \pm SFM.

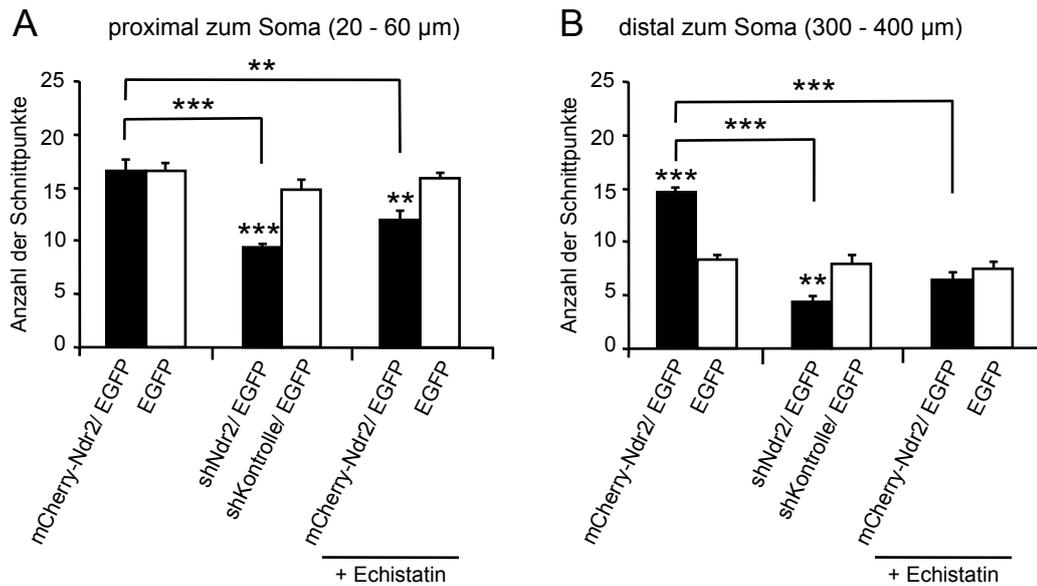


Abbildung 4.6: Vergleich proximaler und distaler Dendriten

A Eine genauere Betrachtung des proximalen Dendritenbaumes in Ndr2-transfizierten Neuronen zeigte, dass eine Überexpression von Ndr2 die Verzweigung der Dendriten nahe des Somas nicht beeinflusste. Hingegen führte eine Blockierung der Expression endogener Ndr2 zu einer Reduktion der Dendritenverzweigung. Zudem inhibierte Echistatin die Verzweigung des proximalen Dendritenbaumes von Ndr2-transfizierten Neuronen, nicht aber von Kontrollneuronen. **B** Die distalen Dendriten Ndr2-überexprimierender Neurone zeigten in ihrem Verzweigungsgrad eine massive Erhöhung, welche jedoch durch Echistatin blockiert wurde. Indes führte die Inhibierung der Expression endogener Ndr2 sogar zu einer Reduktion der Verzweigung des distalen Dendritenbaumes hippocampaler Neurone. Die Werte sind dargestellt als MW ± SFM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ im Vergleich zu EGFP oder der Markierung

der Art der Transfektion und der Behandlung mit Echistatin beobachtet werden ($F_{58, 7888} = 1,424$; $p = 0,019$). Dabei zeigte sich, dass nach der Blockierung der Integrin-Ligandenbindungsstelle durch Echistatin (Abb. 4.4 und 4.5 C) die Ndr2-vermittelte Erhöhung der dendritischen Verzweigung von hippocampalen Primärneuronen aufgehoben war ($F_{1, 68} = 2,442$; $p = 0,123$). Bei einer genaueren Betrachtung zeigte sich, dass Echistatin (Abb. 4.6 A) eine Reduktion der Verzweigung im proximalen Bereich der Dendriten von Ndr2-transfizierten Neuronen induzierte (mCherry-Ndr2/EGFP: $11,85 \pm 0,82$; EGFP: $15,67 \pm 0,58$; Fischer's PLSD, $p = 0,000$), während im distalen Bereich (Abb. 4.6 B) des Dendritenbaumes der Neurone ein ähnliches Verzweigungsmuster wie das von Echistatin behandelten Kontrollzellen zu beobachten war (mCherry-Ndr2/EGFP: $6,49 \pm 0,67$; EGFP: $7,59 \pm 0,58$; $p = 0,188$ n.s.). Dabei hatte eine Behandlung mit Echistatin keinen Effekt auf die Verzweigung der proximalen und distalen Bereiche des Dendritenfeldes von EGFP-transfizierten Neuronen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (proximal: $p = 0,497$ n.s., distal: $p = 0,596$ n.s.).

4.1.3 Ndr2 reguliert den Gehalt aktivierten β 1-Integrins in auswachsenden neuronalen Strukturen und ist am Integrin-Endozytose/Exozytose-Signalweg beteiligt

4.1.3.1 Transgene Ndr2 erhöht den Gehalt an phosphoryliertem β 1-Integrin in den Wachstumskegeln von PC-12 Zellen

Aufgrund der beobachteten Regulation des Integrin-abhängigen Neuritenwachstums durch die Serin/Threonin-Kinase Ndr2 untersuchte ich im Folgenden, ob Ndr2 Einfluss auf die Verteilung von β 1-Integrinen in auswachsenden Strukturen wie z.B. Wachstumskegeln nimmt. Das Integrin β 1 besitzt mehrere Phosphorylierungsstellen, wobei Threonin⁷⁸⁸ im C-terminalen, zytosolischen Teils des Proteins eine davon ist. Diese ist wichtig für die Aktivität des Zelladhäsionsmoleküls, da eine Phosphorylierung von Threonin⁷⁸⁸ über eine *inside-out*-Aktivierung die Bindungsaffinität von β 1-Integrin zu seinem Liganden stark erhöht (Nilsson et al., 2006). Studien haben gezeigt, dass die Expression einer mutierten Form von β 1-Integrin, welche anstelle von Threonin⁷⁸⁸ die Aminosäure Alanin kodierte, die Zelladhäsion stark reduzierte (Craig et al., 2009). Mithilfe der oben beschriebenen PC12-Zelllinie EGFP-Ndr2 und eines Antikörpers, welcher spezifisch nur die phosphorylierte Form von Threonin⁷⁸⁸ erkannte, wurde die Verteilung von aktiviertem β 1-Integrin in NGF-stimulierten und auf PDL oder Kollagen IV kultivierten Zellen untersucht.

In der Abbildung 4.7 A sind mit EGFP-Ndr2 stabil-transfizierte PC12-Zellen dargestellt.

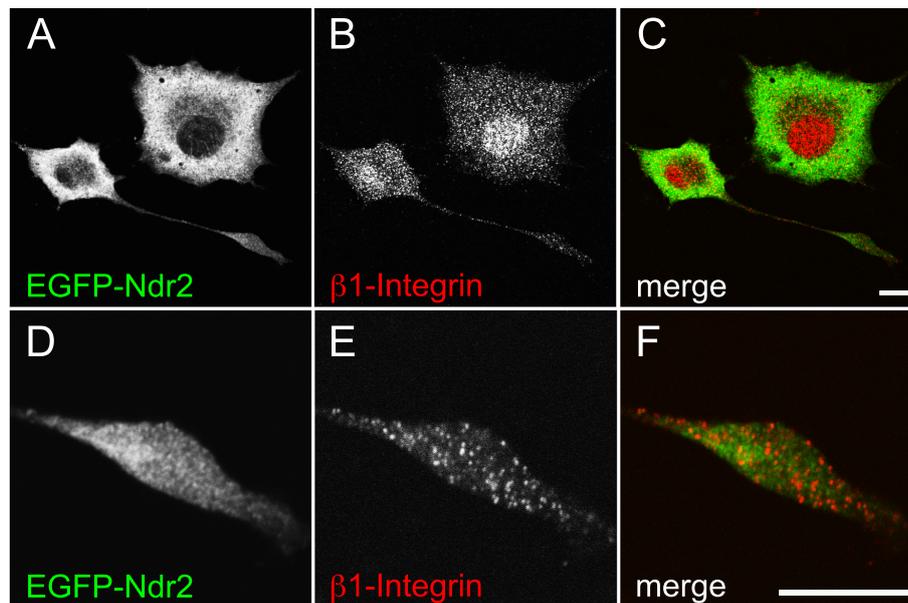


Abbildung 4.7: Immunfluoreszenzfärbung EGFP-Ndr2-transfizierter PC12-Zellen
 In EGFP-Ndr2 transfizierten PC12-Zellen lag transgenes Ndr2 sowohl in den Somata, in den Neuriten (A) sowie in den Wachstumskegeln (D) der Zellen verteilt vor. Weiterhin konnte für Threonin⁷⁸⁸-phosphoryliertes β 1-Integrin eine punktierte Verteilung und eine Kolokalisation mit EGFP-Ndr2 sowohl in den Somata (B & C) als auch in den Wachstumskegeln der Neuriten (E & F) beobachtet werden. Maßstab: A - F 10 μ m

Während transgenes Ndr2 eine gleichmäßige Verteilung sowohl in den Somata (A) als auch in den Wachstumskegeln (D) zeigte, konnte für Threonin⁷⁸⁸-phosphoryliertes β 1-Integrin eine punktierte Verbreitung ebenfalls in der gesamten Zelle beobachtet werden (B & E). Beide Proteine kolokalisieren in den Zellkörpern, Neuriten sowie in Wachstumskegeln (C & F) von PC12-Zellen.

Mittels der Immunzytochemie konnte nun eine quantitative Analyse der Intensität des Fluoreszenzsignals von Threonin⁷⁸⁸-phosphoryliertem β 1-Integrin folgen (Abb. 4.8). Eine statistische Auswertung der gewonnenen Daten mit einer univariaten Varianzanalyse ergab für die drei Zelllinien EGFP-Ndr2, EGFP-Ndr2 Mutante und EGFP einen signifikanten Effekt ($F_{2,60} = 5,895$; $p = 0,005$). Jedoch konnte keine signifikante Interaktion zwischen den drei Zelllinien und den beiden unterschiedlichen Zellsubstraten PDL und Kollagen IV beobachtet werden ($F_{2,60} = 0,102$; $p = 0,904$). Eine Analyse der auf den Zellkörper normierten Färbeintensität belegte eine erhöhte Menge an phosphoryliertem β 1-Integrin in den Wachstumskegeln von EGFP-Ndr2-exprimierenden Zellen im Vergleich zu Zellen, welche nur EGFP (Fischer's PLSD, $p = 0,003$) oder die phosphorlierungsinactive Form von Ndr2 EGFP-Ndr2 Mutante exprimierten ($p = 0,008$). Diese Erhöhung war substratunabhängig und konnte sowohl für EGFP-Ndr2-transfizierte Zellen, welche auf PDL als auch auf Kollagen IV kultiviert wurden, beobachtet werden (PDL: $115,4 \pm 42,3$; Kollagen IV: $97,2 \pm 39,3$). Zellen der Linien EGFP-Ndr2 Mutante (PDL: $37,3 \pm 11,9$; Kollagen IV: $33,7 \pm 17,1$) zeigten im Vergleich zu Kontrollzellen (PDL: $23,6 \pm 6,8$; Kollagen IV: $28,2 \pm 10,5$) hingegen keine Erhöhung an Threonin⁷⁸⁸-phosphoryliertem β 1-Integrin in ihren Wachstumskegeln ($p = 0,710$ n.s.).

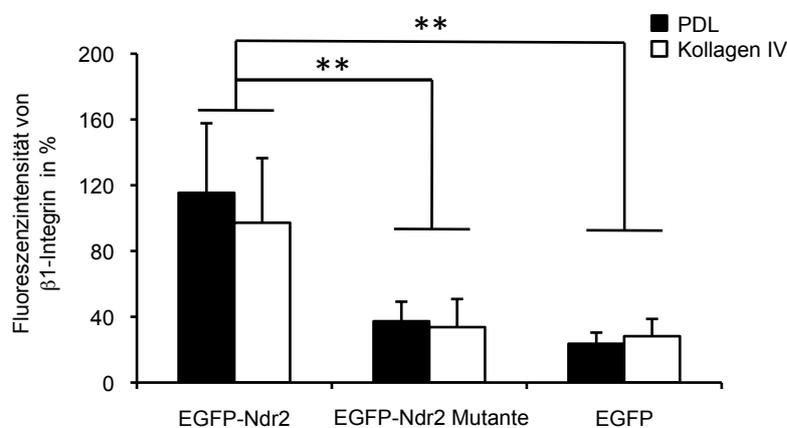


Abbildung 4.8: Intensitätsanalyse immunfluoreszenzmarkierten β 1-Integrins in Wachstumskegeln

Unabhängig von dem Substrat auf welchem die Zellen kultiviert wurden, zeigten mit EGFP-Ndr2 transfizierte PC12-Zellen (EGFP-Ndr2 und EGFP: $n = 10$ PDL, $n = 10$ Kollagen IV) im Verhältnis zum Zellkörper eine Erhöhung an Threonin⁷⁸⁸-phosphoryliertem β 1-Integrin in ihren Wachstumskegeln. Jedoch konnte diese Induktion in Zellen, welche eine phosphorlierungsinactive Form von Ndr2 exprimierten nicht beobachtet werden (EGFP-Ndr2 Mutante: $n = 10$ PDL, $n = 10$ Kollagen IV). Die Werte sind dargestellt als MW \pm FM * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ im Vergleich zu EGFP-Ndr2

4.1.3.2 Transgene Ndr2 zeigt eine punktierte Verteilung und lokalisiert an frühe Endosomen

Wie bereits in den Abbildungen 4.2 und 4.4 beobachtet werden konnte, zeigte sowohl die endogene als auch transgene Ndr2-Kinase in hippokampalen Primärneuronen eine stark punktierte Verteilung.

In der Abbildung 4.9 ist ein transfiziertes hippokampales Primärneuron zum Zeitpunkt DIV7 zu sehen. Die Zelle exprimerte zum einen EGFP-fusionierte Ndr2 und zum anderen ECFP-markiertes SARA-FYVE. Das Protein ECFP-SARA-FYVE beinhaltet die Zinkfingerdomäne FYVE des Proteins SARA (Smad anchor of receptor activation). Die Domäne ist benannt nach den Anfangsbuchstaben der vier Proteine, in welchen dieses Motiv als erstes gefunden wurde: Fab1, YotB, Vac1p und EEA1 (Stenmark et al., 1996). Proteine wie SARA und EEA1 (early endosomal antigen 1) binden über die hoch konservierte FYVE-Domäne mit einer hohen Spezifität an Phosphatidylinositol 3-Phosphat, ein Transmembranprotein das in der Membran von frühen Endosomen vorkommt (Gaullier et al., 1998). Für das in dieser Studie verwendete ECFP-konjugierte Konstrukt mit der FYVE-Domäne von SARA konnte gezeigt werden, dass es ebenfalls an frühen Endosomen bindet (Hayakawa et al., 2004) und somit als Markerprotein für diese eingesetzt werden kann.

Die beiden transgenen Proteine EGFP-Ndr2 und ECFP-SARA-FYVE zeigten in hippokampalen Primärneuronen eine starke punktierte Verteilung sowie eine hohe Kolo-kalisation (A, B & C) in den Somata (D, E & F) und Neuriten (G, H & I). Diese punktierte Verteilung wurde bereits für ECFP-SARA-FYVE sowie für EEA1 und Rab5 beschrieben (Hayakawa et al., 2004; Hu et al., 2002). Transgenes Ndr2 ist somit ebenfalls an frühen Endosomen lokalisiert.

4.1.3.3 Endogene Ndr2 kolokalisiert mit β 1-Integrin und ist ebenfalls an frühen und an Recycling-Endosomen lokalisiert

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Serin/Threonin-Kinase Ndr2 abhängig von der Integrin-vermittelten Zelladhäsion das Neuritenlängenwachstum in PC12-Zellen und die Verzweigung der Dendriten von hippokampalen Primärneuronen reguliert. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Ndr2 in PC12-Zellen den Anteil an phosphoryliertem β 1-Integrin in den Wachstumskegeln erhöht. Aufgrund dieser Daten und der Kolo-kalisation von EGFP-Ndr2 mit frühen Endosomen stellte sich die Frage, ob endogenes Ndr2 mit im endosomalen Kompartiment befindlichen β 1-Integrin kolokalisiert ist.

Zunächst wurde überprüft, ob die in Neuronen endogen exprimierte Ndr2-Kinase ebenfalls an frühen Endosomen lokalisiert. An diese vesikulären Strukturen bindet die kleine GTPase Rab5 in ihrer GTP gebunden aktiven Form (Mishra et al., 2010). Mithilfe einer Immunfluoreszenzfärbung konnte tatsächlich gezeigt werden, dass Ndr2 mit Rab5 in hippokampalen Primärneuronen in den Somata (A & B) sowie in den Neuriten (E & F) stark kolokalisiert. Beide Proteine zeigten eine punktierte Verteilung in der gesamten Zelle. Eine solche Verteilung wurde für Rab5 bereits von Hu et al. (2002) beschrieben. Weiterhin konnte ich zeigen, dass Ndr2 auch mit β 1-Integrin in den Somata (D) sowie in den Neuriten (H) hippokampaler Primärneurone in ihrer Verteilung überlappte und beide zusammen häufig mit Rab5 kolokalisierten.

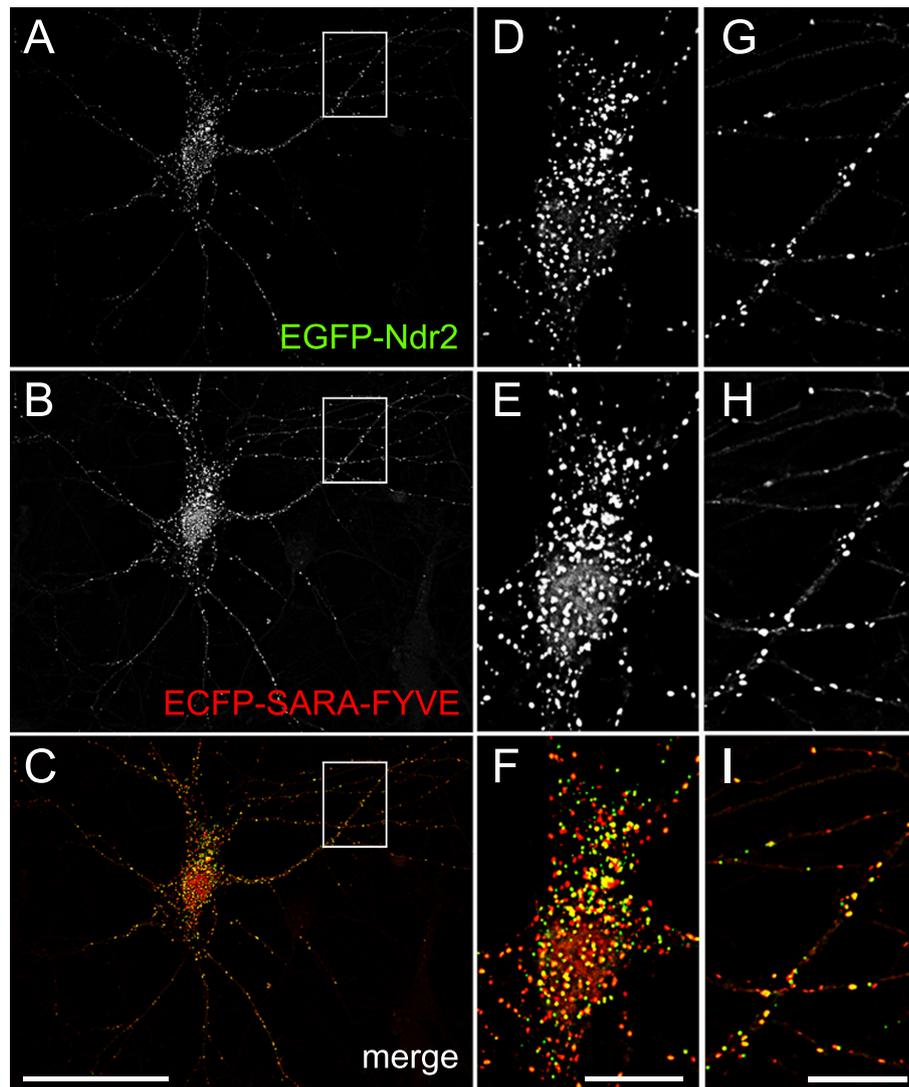


Abbildung 4.9: Lokalisation transgener Ndr2 an frühen Endosomen in hippocampalen Primärneuronen (DIV7)

Transgenes EGFP-Ndr2 (A) zeigte in hippocampalen Primärneuronen eine starke punktierte Verteilung sowohl in den Somata (D) als auch in den Neuriten der Zellen (G). Interessanterweise konnte für EGFP-Ndr2 eine hohe Kolokalisation mit dem Marker für frühe Endosomen ECFP-SARA-FYVE (C, F & I) beobachtet werden, welcher ebenfalls eine punktierte Verteilung im Soma (E) und in Neuriten (H) aufwies. Maßstab: A - C 50 μm ; D - I 10 μm

In einem weiteren Schritt sollte nun mithilfe einer Immunfluoreszenzfärbung gegen die GTPase Rab11, welche an Recycling-Endosomen bindet (Caswell and Norman, 2008), geklärt werden, ob Ndr2 ebenfalls an diesen lokalisiert ist. Es zeigte sich (Abb. 4.11), dass beide Proteine, Ndr2 und Rab11, eine punktierte Verteilung in den Somata (A & B) wie auch in den Neuriten (F & G) hippocampaler Primärneuronen aufwiesen und miteinander kolokalisierten. Diese typische vesikuläre Verteilung von Rab11 wurde auch in der Arbeit von Eva et al. (2010) beschrieben. Hinzukommend konnte, wie zuvor für Rab5-positive frühe Endosomen gezeigt wurde, eine Überlappung der Verteilung von Ndr2 und β 1-Integrin an Rab11-positiven Recycling-Endosomen (D & H) beobachtet werden.

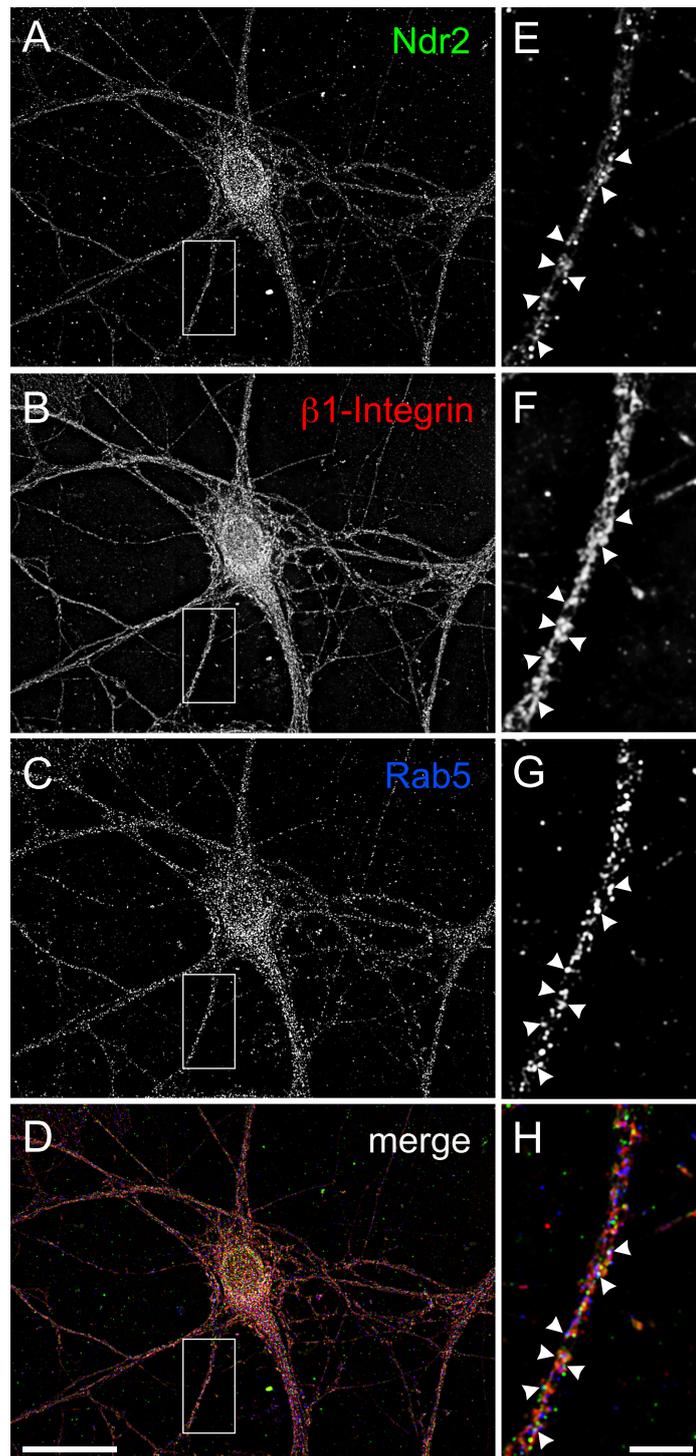


Abbildung 4.10: Lokalisation von Ndr2 an Integrin-positiven frühen Endosomen hippocampaler Primärneurone (DIV14)

In hippocampalen Primärneuronen zeigte die endogen exprimierte Ndr2-Kinase, ähnlich wie transgene Ndr2 eine punktierte Verteilung in den Somata (A) und den Neuriten (E). Mithilfe einer Immunfluoreszenzfärbung für β 1-Integrin (B & F) und Rab5 (C & G) konnte auch für Ndr2 eine Lokalisation an frühen Endosomen sowie eine Kolokalisation mit β 1-Integrinen an diesen vesikulären Strukturen sowohl im Soma (D) als auch in den Neuriten (H) bestätigt werden. Maßstab: A - D 25 μ m; E - H 5 μ m

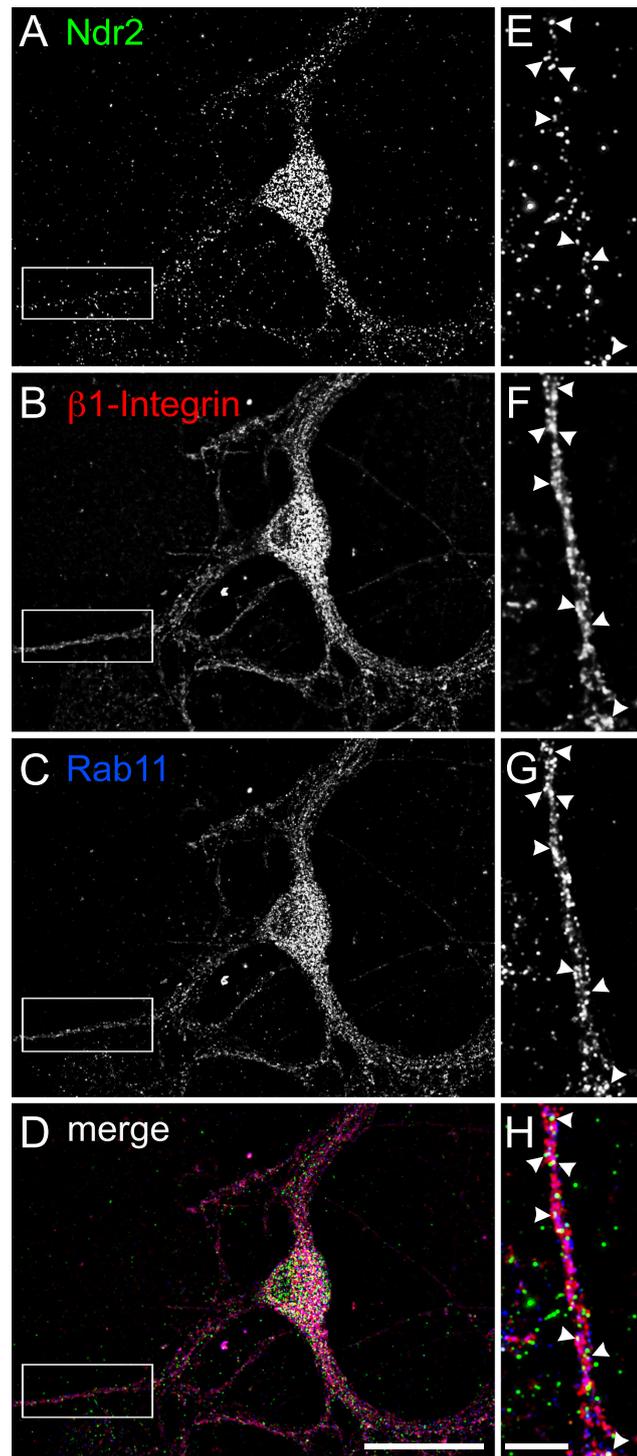


Abbildung 4.11: Lokalisation von Ndr2 an Integrin-positiven Recycling-Endosomen hippocampaler Primärneurone (DIV14)

Für die endogen exprimierte Ndr2-Kinase (A & E) konnte auch eine Lokalisation an Rab11-positiven Recycling-Endosomen (C & G) in hippocampalen Primärneuronen beobachtet werden. Beide Proteine zeigten zusammen mit β 1-Integrin (B & F) eine Kolo­kalisation sowohl im Soma (D) als auch in den Neuriten (H) der Neurone. Maßstab: A - D 25 μ m; E - H 5 μ m

4.1.3.4 Ndr2 liegt nur in mit Endosomen angereicherten zellulären Fraktionen vor

Eine subzelluläre Fraktionierung von nativen PC12-Zellen mittels einer Saccharosegradienten-Zentrifugation konnte die Beobachtung bestätigen, dass Ndr2 mit frühen sowie Recycling-Endosomen assoziiert ist (Abb. 4.12). Der hier verwendete kontinuierliche Gradient mit einem prozentualen Anteil an Saccharose von 10-40% ermöglichte es frühe bzw. Recycling-Endosomen von anderen vesikulären Strukturen wie den Lysosomen, dem Endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat zu trennen. Mittels der Verfahren SDS-PAGE und Western-Blot konnte die Ndr2-Kinase nur in den Zellfraktionen 2 und 3 in ähnlicher Proteinmenge nachgewiesen werden. Diese Fraktionen waren positiv für die GTPasen Rab5 und Rab11, welche an frühen bzw. Recycling-Endosomen binden. Rab5 war reichlich in der Fraktion 2 und geringer in der Fraktion 3 angereichert, wohingegen die GTPase Rab11 sehr stark in den Fraktionen 1 bis 3 und in geringer Menge in der Fraktion 4 nachzuweisen war. Somit lag Ndr2 nur in Endosomen enthaltenden Fraktionen vor und bestätigte so vorhergehende Beobachtungen einer Lokalisation von Ndr2 an frühen und Recycling-Endosomen. Die GTPase Rab5 zeigte nur in den Fraktionen des Saccharosegradienten nicht aber im PC12-Zellysate eine Doppelbande. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass möglicherweise durch eine Anlagerung von Saccharose das Molekulargewicht der Proteine vergrößert wurde.

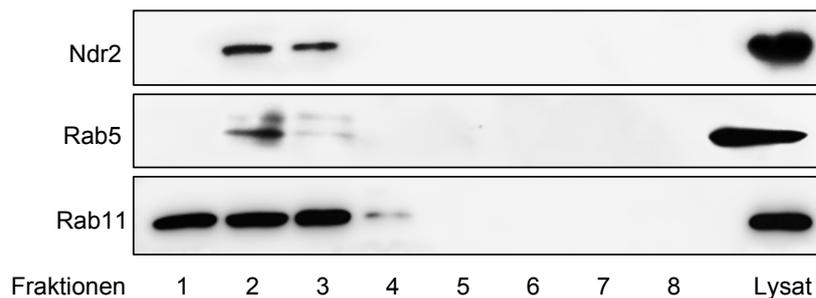


Abbildung 4.12: Nachweise von Ndr2 in endosomalen Fraktionen von PC12-Zellen
Mithilfe einer Saccharosegradienten-Zentrifugation wurden die einzelnen subzellulären Kompartimente von PC12-Zellen voneinander getrennt. Ndr2 lag dabei selektiv in den Fraktionen 2 und 3 vor, welche ebenfalls die GTPasen Rab5 und Rab11 beinhalteten. Somit konnte eine Assoziation von Ndr2 mit Rab5-positiven frühen Endosomen und Rab11-positiven Recycling-Endosomen mit dieser Methode bestätigt werden.

4.1.3.5 Ndr2 interagiert mit der GTPase Dynamin

Vorhergehende Beobachtungen einer punktierten Verteilung von Ndr2 in der Zelle und der Lokalisation an frühen und Recycling-Endosomen sowie einer Erhöhung von aktiviertem β 1-Integrin in den Wachstumskegeln von Ndr2-transfizierten PC12-Zellen führte zu der Vermutung, dass Ndr2 in dem Integrin-Endozytose/Exozytose-Signalweg eine wichtige Rolle spielen könnte. Aus diesem Grund suchte ich mithilfe einer Koimmunpräzipitation nach potentiellen Interaktionspartnern von Ndr2, die an diesem Signalweg beteiligt sind.

Wie in der Abbildung 4.13 zu sehen ist, konnte mit einem polyklonalen Antikörper, der an den Aminosäureabschnitt 420 bis 430 von Ndr2 bindet (Stork et al., 2001), die GTPase Dynamin koimmunpräzipitiert werden. Für die Detektion der GTPase Dynamin wurde

ein Antikörper verwendet, welcher die Isoformen 1 und 2 nicht aber 3 erkannte. Während die Isoform 2 ubiquitär exprimiert wird, kommt die Isoform 1 nur im Gehirn und besonders stark angereichert in Synapsen vor. Dynamin vermittelt während der Endozytose die Abschnürung der Vesikel von der Plasmamembran (Hinshaw, 2000). Weitere Proteine, welche ebenfalls bei der Endozytose eine Rolle spielen, wie Amphiphysin (Wigge and McMahon, 1998) und Synaptojanin 1 (Song and Zinsmaier, 2003) sowie die an frühen bzw. Recycling-Endosomen bindenden GTPasen Rab5 bzw. Rab11, konnten indes nicht im Präzipitat nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Somit konnte bis jetzt nur eine direkte Interaktion für Ndr2 mit der GTPase Dynamin (1/2) nachgewiesen werden.

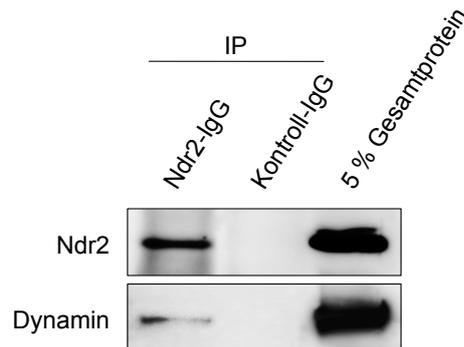


Abbildung 4.13: Koimmunpräzipitation von Dynamin (1/2) mit Ndr2

Mithilfe eines Ndr2-spezifischen Primärantikörpers wurde Ndr2 über diesen Antikörper selektiv präzipitiert und die GTPase Dynamin kopräzipitiert. Weiterhin ist anhand der Western-Blots zu sehen, dass sowohl Ndr2 als auch Dynamin nicht mit einem für beide Proteine unspezifischen Primärantikörper interagierten. Dieser stammte aus dem gleichen Wirt und der gleichen Immunglobulinklasse wie der Ndr2-spezifische Primärantikörper.

4.1.3.6 Ndr2 kolokalisiert mit Dynamin und β 1-Integrin

In der Arbeit von Caswell und Norman 2008 ist beschrieben, dass die GTPase Dynamin sowohl eine Clathrin-abhängige als auch eine Clathrin-unabhängige Endozytose von Integrinen vermittelt. Aufgrund der zuvor beschriebenen Interaktion von Ndr2 mit Dynamin sowie der Kolokalisation mit β 1-Integrin an frühen und Recycling-Endosomen, sollte nun geklärt werden, ob diese drei Proteine in hippocampalen Primärneuronen ebenfalls gemeinsam vorliegen. In der Tat konnte mit einer Immunfluoreszenzfärbung (Abb. 4.14) bestätigt werden, dass Ndr2 mit Dynamin sowohl in den Somata (A & B) als auch in den Neuriten (E & F) hippocampaler Primärneuronen kolokalisierte und mit β 1-Integrin in punktförmigen Strukturen überlappte (D & H).

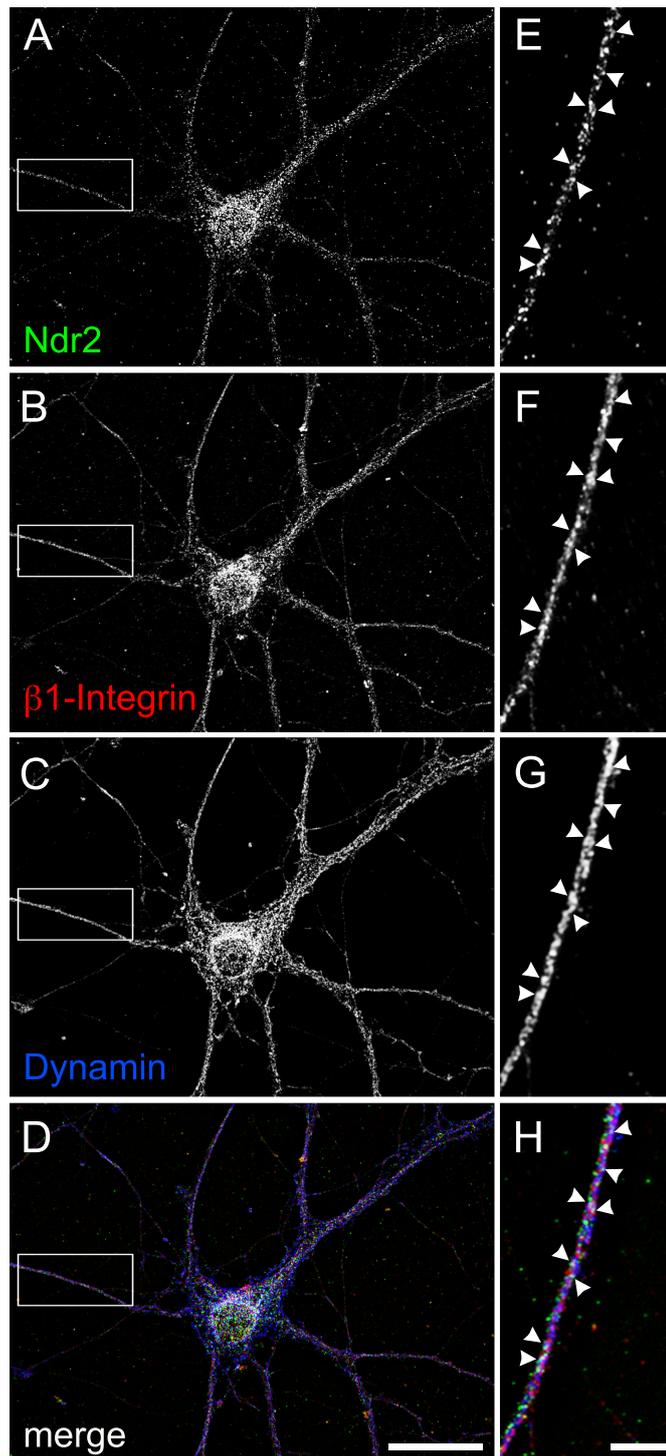


Abbildung 4.14: Kolokalsiation von Ndr2 mit β 1-Integrin und Dynamin in hippocampalen Primärneuronen (DIV14)

Ndr2 kolokalisierte mit β 1-Integrin (B & F) und Dynamin (C & G) sowohl im Soma (D) als auch in den Neuriten (H) hippocampaler Primärneurone. Dabei lagen alle drei Proteine zusammen oft als punktförmiger Komplex gemeinsam vor (E, F, G & H) Maßstab: A - D 25 μ m; E - H 5 μ m

4.1.4 Charakterisierung der konditionalen Ndr2-transgenen Mauslinien Ndr2^{lox/tg55} und Ndr2^{lox/tg89}

4.1.4.1 Generierung konditional Ndr2-transgener Mauslinien

Für eine Untersuchung der Bedeutung der Serin/Threonin-Kinase Ndr2 *in vivo* wurde ein konditionales Ndr2-transgenes Mausmodell generiert. Dieses wurden gewählt, da über das Cre/loxP-Rekombinasesystem eine gewebe-, zelltyp- bzw. entwicklungs- und altersspezifische Induktion der Expression des Transgens ermöglicht wird (Utomo et al., 1999).

4.1.4.2 Struktur der Ndr2-Expressionskassette

Für die Generierung konditionaler Ndr2-transgener Mäuse wurde eine Ndr2-Expressionskassette (Abb. 4.15) verwendet.

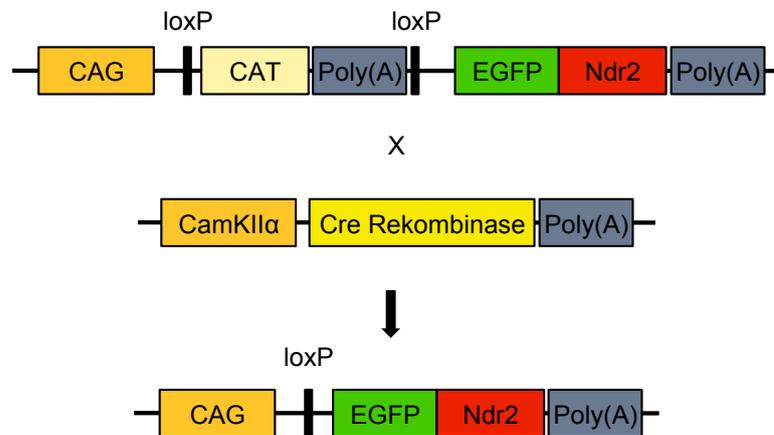


Abbildung 4.15: Modell der Ndr2-Expressionskassette

In der Expressionskassette lag vor dem Gen für EGFP-Ndr2 ein mit loxP-Sequenzen flankiertes Gen für das Enzym Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) lokalisiert. Aufgrund dieses Aufbaus wurde in Ndr2-transgenen Mäusen das Fusionsprotein EGFP-Ndr2 nicht exprimiert, da es aufgrund des Stoppsignals im Gen für CAT zu einem Abbruch der Transkription kam. Wurden Ndr2-transgene Mäuse jedoch mit transgenen Mäusen verpaart, die z. B. unter dem CamKIIα-Promotor die Cre-Rekombinase exprimierten, kam es zu einer katalytischen Deletion des loxP-flankierten Bereiches und zu einer Expression von EGFP-Ndr2 unter dem CAG-Promotor.

Diese ermöglichte nach einer enzymatischen Reaktion durch eine Cre-Rekombinase die Expression von Ndr2 als Fusionsprotein mit dem fluoreszierenden Protein EGFP unter der Kontrolle des CAG-Promotors. Der in der Expressionskassette kodierte Promotor stellt eine Kombination aus dem Cytomegalovirus Enhancer Element (CMV) und dem aus *Gallus gallus* stammenden β -Aktin Promotor dar und ermöglicht somit eine ubiquitäre Verteilung sowie ein hohes Expressionslevel des EGFP-Ndr2 Proteins (Alexopoulou et al., 2008). Vorgeschaltet vor dem Gen für EGFP-Ndr2 wird das Enzym Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) kodiert. Dieses Enzym acetyliert das Antibiotikum Chloramphenicol und hebt somit dessen antibakterielle Wirkung auf. Eine Expression in Eukaryoten hat keine Relevanz, nur Bakterien, welche die genetische Information der CAT kodieren, sind resistent gegenüber Chloramphenicol und können somit von nicht-transformierten Bak-

terien selektioniert werden (Shaw et al., 1979). Sowohl das CAT-Gen als auch das Gen für EGFP-Ndr2 weisen am 3'-Ende eine aus dem Virus SV40 stammende Erkennungssequenz (Poly(A)) für das Enzym Poly(A)-Polymerase auf. Dieses Enzym knüpft während der Transkription der Gene mehrere Adeninnukleotide an die synthetisierte mRNA an. Diese Polyadenylierung ist notwendig für die Stabilität, aber auch für die Translation der mRNA (Lodish, 2007).

In der verwendeten Expressionskassette lag das CAT-Gen flankiert durch zwei loxP-Sequenzen vor. Da es aufgrund des Stopp-Signal im CAT-Gen zu einer Termination der Transkription kam, wurde die Expression von EGFP-Ndr2 in Ndr2-transgenen Mäusen unterbunden. Die loxP-Sequenzen werden von dem aus dem bakteriellen P1-Phagen stammenden Cre-Rekombinase Enzym erkannt, so dass dieses katalytisch die flankierte DNA ausschneidet (Sauer and Henderson, 1988). Eine Verpaarung mit Cre-Rekombinase-transgenen Mäusen führte somit in Ndr2-transgenen Mäusen zu einer Induktion der Expression von EGFP-Ndr2.

Die Generierung der konditionalen Ndr2-transgenen Mauslinien wurde kommerziell von der Firma Polygene durchgeführt. Hierfür wurde die als Plasmid-DNA vorliegende Ndr2-Expressionskassette in den Pronucleus einer Zygote injiziert. Die für die Pronucleusinjektion verwendete Samenzelle und Eizelle stammten aus CB6F2 Mäusen. Diese ursprünglich aus dem CBA-Inzuchtstamm kommenden Mäuse wurden über zwei Generationen mit C57BL/6 Mäusen verpaart. Mehrere transfizierte Eizellen wurden nun anschließend in eine pseudoschwangere C57BL/6 Maus eingepflanzt. Die Nachkommen wurden nun daraufhin getestet, ob eine Insertion der Expressionskassette in ihr Genom stattgefunden hat. Hierfür wurde eine PCR durchgeführt, mit Primern, die direkt innerhalb der Sequenz des Fusionsproteines EGFP-Ndr2 binden. In der Abbildung 4.16 sind die gewonnenen PCR-Produkte zusehen. Es konnte nur für drei Nachkommen eine Insertion der Ndr2-Expressionskassette nachgewiesen werden. Als Kontrolle diente die Plasmid-DNA des Transgenes. Die identifizierten Ndr2-transgenen Mäuse wurden aufgrund der Reihenfolge innerhalb der gewonnenen Nachkommen mit „Ndr2^{lox/tg55}“, „Ndr2^{lox/tg68}“ und „Ndr2^{lox/tg89}“ bezeichnet.

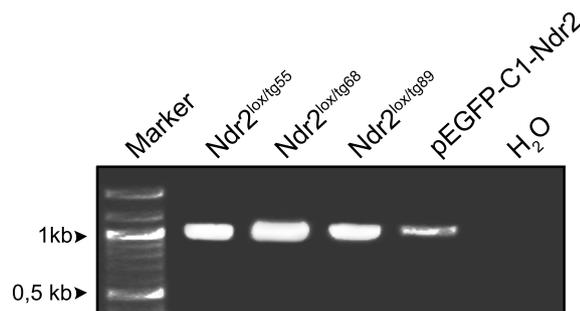


Abbildung 4.16: Nachweis Ndr2-transgener Mäuse

Mithilfe einer PCR-Analyse der aus einer Schwarzbiopsie gewonnenen genomischen DNA wurden die Nachkommen auf eine mögliche Insertion der Ndr2-Expressionskassette in ihr Genom überprüft. Es konnten drei Ndr2-transgene Mäuse mit der Nummerierung 55, 68 und 89 identifiziert werden. Dabei diente die für die Pronucleusinjektion verwendete Plasmid-DNA (pEGFP-C1-Ndr2) als Positivkontrolle für die Genotypisierung.

4.1.4.3 Die Insertion der Ndr2-Expressionskassette erfolgte in einer Tandemreihenfolge

Für die Generierung Ndr2-transgener Mäuse lag die injizierte Ndr2-Expressionskassette als Plasmid-DNA vor. Dadurch ist es aufgrund der Zufallsverteilung sehr wahrscheinlich, dass gleich mehrere Kopien der Expressionskassette in das Genom der Mäuse inseriert wurden (Mülhardt, 2008). Dabei kann man nicht ausschließen, dass eine oder mehrere Kopien sich nicht in der gleichen 5'-3'-Leserasterrichtung eingebaut haben. Ist dies der Fall, kann es bei einer Verpaarung Ndr2-transgener Mäuse mit Cre-Rekombinase-transgenen Mäusen zu einer Deletion mehrerer oder gar aller Kopien kommen. Um dies zu testen, wurden drei verschiedene PCR-Analysen vorgenommen. Für zwei wurde entweder nur der Sense-Primer oder nur der Antisense-Primer in den Ansätzen verwendet. Der Sense-Primer bindete sowohl innerhalb der Sequenz des Ndr2-Gens als auch in der angrenzenden Poly(A)-Sequenz, während der Antisense-Primer in der CMV-Region des CAG-Promotors bindete. Kam es nun zu einem Einbau einer oder mehrerer invertierter Kopien, so wäre in dem PCR-Ansatz mit dem Sense-Primer bzw. dem Antisense-Primer ein ca. 400 pb bzw. 600 bp großes Fragment zu erwarten gewesen. In der Abbildung 4.17 sind die gewonnenen PCR-Fragmente aller drei Ansätze dargestellt. Es konnte aus dem Genom von Mäusen der drei Linien $Ndr2^{lox/tg55}$, $Ndr2^{lox/tg68}$ und $Ndr2^{lox/tg89}$ nur in dem PCR-Ansatz, in dem beide Primer (Sense und Antisense) verwendet wurden, ein ca. 500 bp großes DNA-Konstrukt synthetisiert werden. Damit lag in allen drei Mauslinien die Ndr2-Expressionskassette nachweislich in einer Tandemreihenfolge inseriert vor. Wie viele Kopien eingebaut wurden, konnte mit dieser Methode jedoch nicht bestimmt werden.

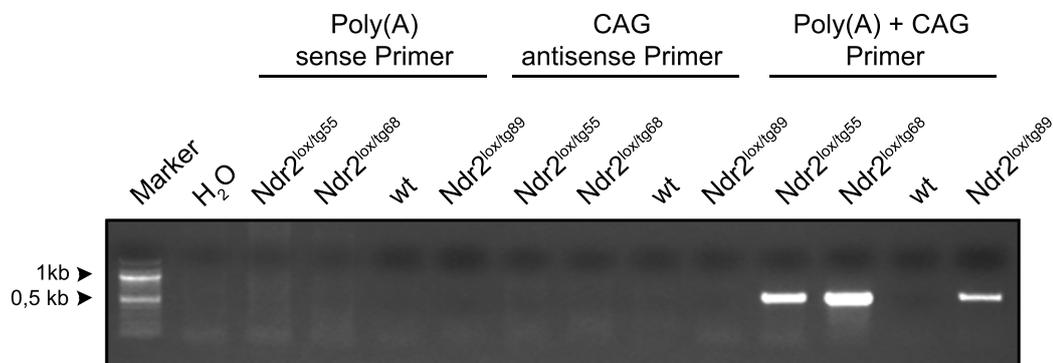


Abbildung 4.17: PCR-Analyse der im Genom vorliegenden Ndr2-Expressionskassette

Mithilfe drei verschiedener PCR-Ansätze sollte analysiert werden, ob sich die Kopien der Ndr2-Expressionskassette in der richtigen 5'-3'-Leserasterrichtung in das Genom der Mäuse eingebaut hatten. Es zeigt sich in den Nachkommen der drei Linien, $Ndr2^{lox/tg55}$, $Ndr2^{lox/tg68}$ und $Ndr2^{lox/tg89}$, nur bei einer Verwendung beider Primer ein Nachweis der Ndr2-Expressionskassette, was auf eine Tandemintegration schließen lässt.

4.1.4.4 Eine Cre-induzierte Expression von EGFP-Ndr2 im Gehirn konnte nur in Mäusen der Linien Ndr2^{lox/tg55} und Ndr2^{lox/tg89} nachgewiesen werden

Durch eine Transkription der Cre-Rekombinase unter einem spezifischen Promotor ermöglicht das Cre/loxP-Rekombinasesystem eine gewebe-, zelltyp- sowie entwicklungs- und altersspezifische Expression eines bestimmten Proteins. Die von Minichiello im Jahr 1999 erstmals beschriebene CamKII-CRE-transgene Mauslinie exprimiert die Cre-Rekombinase unter dem Promotor der Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen Kinase II alpha (CamKII α). CamKII α wird zum größten Teil im Vorderhirn und ausschließlich in exzitatorischen Neuronen exprimiert. Dabei ist die Expression der Kinase im juvenilen Alter am höchsten. Minichiello et al. (1999) konnten in CamKII-CRE-transgenen Mäusen bis zum Zeitpunkt P15 keine bzw. eine geringe Induktion der Expression der Cre-Rekombinase in juvenilen Tieren beobachten. Vom postnatalen Tag 20 an hingegen zeigt sich eine spezifische Verteilung des Enzyms im Hippokampus. Hierbei wird eine sehr starke Expression in den Pyramidenzellen der CA1-Region im Vergleich zu einer weniger starken in den Pyramidenzellen der CA3-Region sowie in den Körnerzellen des Gyrus Dentatus beobachtet. Eine hohe Expression der Cre-Rekombinase ist auch im Neocortex, im Striatum sowie in der Amygdala sichtbar. Sehr schwach hingegen wird die Cre-Rekombinase im Cerebellum und im olfaktorischen Bulb der Mäuse exprimiert. Aufgrund der gewebespezifischen Verteilung und der zu einem späten postnatalen Stadium stattfindenden Induktion der Expression der Cre-Rekombinase wurden Ndr2-transgene Tiere der Linien Ndr2^{lox/tg55}, Ndr2^{lox/tg68} und Ndr2^{lox/tg89} mit CamKII-CRE transgenen Mäusen verpaart. Somit kann ein Einfluss der Überexpression von Ndr2 innerhalb embryonaler und früher postnataler Entwicklungsstadien in den Tieren ausgeschlossen und spätere Differenzierungsvorgänge selektiv analysiert werden.

Zunächst musste überprüft werden, ob im Gehirn doppelt-transgener Mäuse (CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg}) der drei Linien das EGFP-Ndr2 Fusionsprotein exprimiert wird. Dabei wurden aus dem Vorderhirn adulter Tiere die Proteine isoliert und das Fusionsprotein mithilfe eines anti-GFP Antikörpers präzipitiert. Anschließend wurde EGFP-Ndr2 mithilfe eines anti-Ndr2 Antikörpers und eines Western-Blots (Abb. 4.18) detektiert. Es zeigte sich, dass nur in den doppelt-transgenen Mäusen CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg55} und CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg89}, jedoch nicht in CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg68}, das Fusionsprotein EGFP-Ndr2 exprimiert wird. Des Weiteren konnte wie zu erwarten keine Expression in Tieren, die nur für Ndr2 transgen waren, nachgewiesen werden. Somit wird erst durch eine Expression der Cre-Rekombinase die Überexpression von Ndr2 in den transgenen Mäusen induziert. Aufgrund der Ergebnisse fokussierten sich meine weiteren Untersuchungen auf die Linien Ndr2^{lox/tg55} und Ndr2^{lox/tg89}.

4.1.4.5 EGFP-Ndr2 wird in CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg}-transgenen Tieren hauptsächlich in axonalen und dendritischen Fasern exprimiert

In einem weiteren Schritt untersuchte ich nun, in welchen Hirnregionen und zellulären Strukturen das Fusionsprotein EGFP-Ndr2 in CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg}-Mäusen exprimiert wurde. Hierfür wurden Hirnschnitte mithilfe der ABC-Methode und einem anti-GFP Antikörpers EGFP-Ndr2 durch eine enzymatische Reaktion mit Diaminobenzidin (DAB) markiert. In der Abbildung 4.19 ist jeweils ein Übersichtsschnitt einer doppelt-transgenen CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg}-Maus sowie einer wt/Ndr2^{lox/tg}-Kontrollmaus zu sehen. Es zeigt

IP: anti GFP

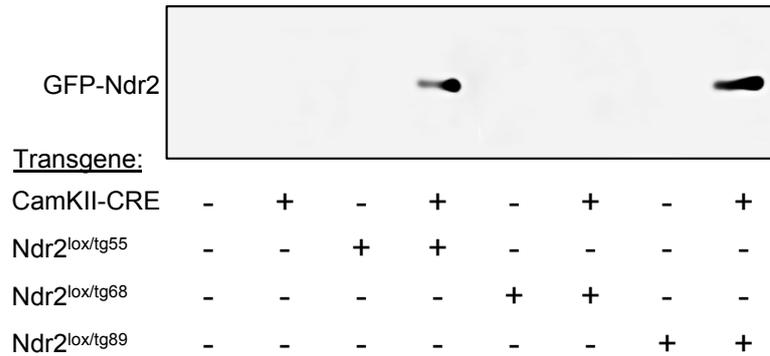


Abbildung 4.18: Expressionsnachweis transgener Ndr2

Über eine Immunpräzipitation wurde das Fusionsprotein EGFP-Ndr2 aus einem Vorderhirnproteinlysate transgener Tiere isoliert und mithilfe eines Western-Blots nachgewiesen. Dabei zeigte sich, dass nur induziert durch eine Expression der Cre-Rekombinase in Ndr2-transgenen Mäusen der Linien Ndr2^{lox/tg55} und Ndr2^{lox/tg89}, EGFP-Ndr2 im Gehirn nachgewiesen werden konnte. Für doppelt-transgene Nachkommen der Linie Ndr2^{lox/tg68} konnte indes keine Expression von EGFP-Ndr2 auf Proteinebene beobachtet werden.

te sich, dass das Fusionsprotein ubiquitär im Vorderhirn exprimiert wird, wobei vor allem eine hohe Expression im Striatum, im primären sensorischen Kortex, im Hippokampus, im Thalamus und der Amygdala von CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg55}- und CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg89}-Mäusen zu beobachten war. Interessanterweise lag dabei transgenes Ndr2 hauptsächlich außerhalb der Zellkörper verteilt vor.

Eine genauere Betrachtung verschiedener Vorderhirnregionen (siehe Abb. 4.20) zeigte im primären somatosensorischen Kortex (A) eine starke Anreicherung von EGFP-Ndr2 im Neuropil der Lamina granularis interna (Schicht IV), in welche die thalamischen Affenzen projizieren. Im Thalamus zeigte sich eine Expression von EGFP-Ndr2 in allen Unterkernen. Außerdem konnte eine starke Anreicherung des Fusionsproteins im Neuropil des Striatums (B) und des Septums (D) beobachtet werden. Hingegen zeigte sich eine geringe Expression von Ndr2-EGFP in den axonalen Faserbündeln der Commissura Anterior (C) und des Corpus Callosum (D). Eine Anreicherung transgener Ndr2-Kinase konnte indes in Zellkörpern des zentralen Subkerns der Amygdala (E) sowie in der Substantia nigra (H) beobachtet werden. Im Hippokampus (F) hingegen war eine hohe Expression des Proteins in den Moosfasern sowie im Stratum moleculare des Gyrus dentatus, aber auch in den Schichten Stratum radiatum, Stratum lacunosum-moleculare und Stratum oriens des Bereiches der CA1-Pyramidenzellen zu beobachten. Verteilung und Strukturierung der Färbung haben in diesen das typische Erscheinungsbild einer Expression in dendritischen Fasern.

4.1.4.6 CamKII-Cre/Ndr2^{lox/tg}-transgene Tiere zeigen im Gehirn keine offensichtlichen Veränderungen in der Dichte und Struktur axonaler Faser und Faserbündel

Aufgrund der Expression von EGFP-Ndr2 in axonalen Fasern, wie in den hippocampalen Moosfasern von CamKII-Cre/Ndr2^{lox/tg55}- und CamKII-Cre/Ndr2^{lox/tg89}-Mäusen, unter-

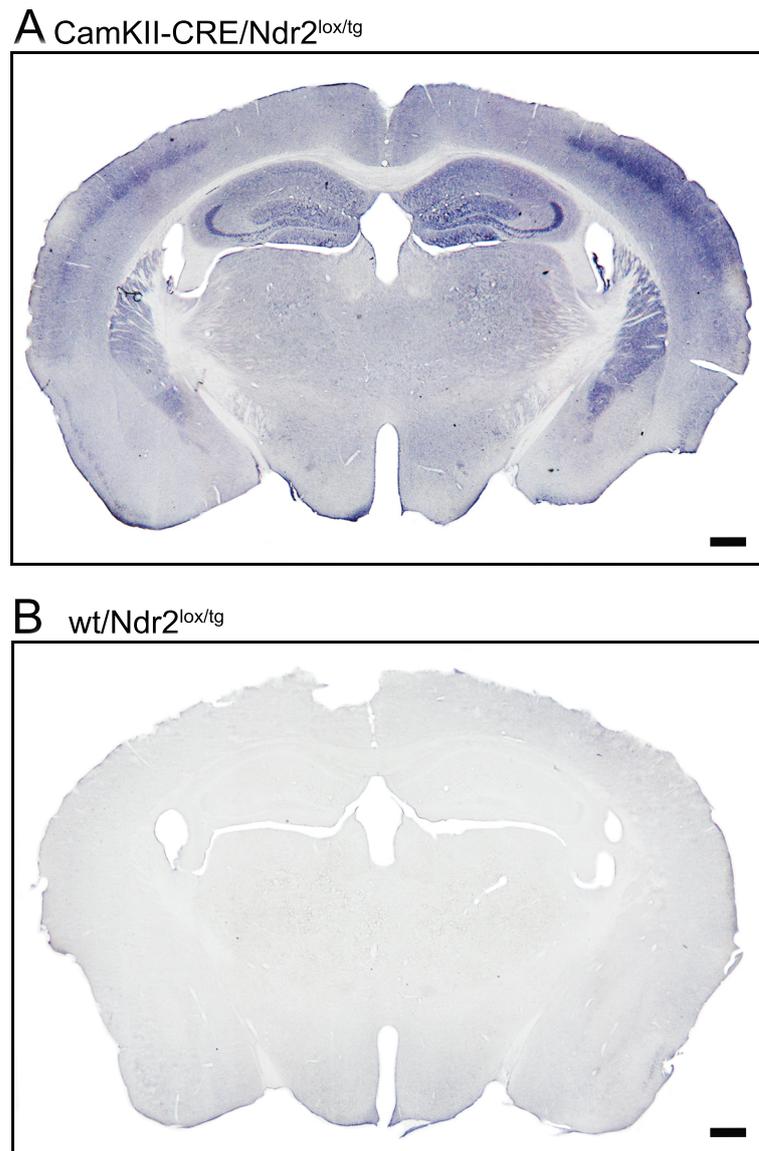


Abbildung 4.19: Expression transgener Ndr2 im Gehirn

EGFP-Ndr2 wies in CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg55}- und CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg89}-Mäusen (A) im Vergleich zu wt/Ndr2^{lox/tg}-Kontrollmäusen (B) eine hohe Expression in vielen Regionen des Vorderhirns wie Striatum, primärer sensorischer Kortex, Hippokampus, Thalamus und Amygdala auf. Besonders im Hippokampus war dabei zu beobachten, dass EGFP-Ndr2 vor allem in den Moosfasern der Körnerzellen stark angereichert vorlag. Abbildung A zeigt auch deutlich die Anreicherung in Schicht IV des somatosensorischen Kortex. Maßstab: A & B 500 μ m

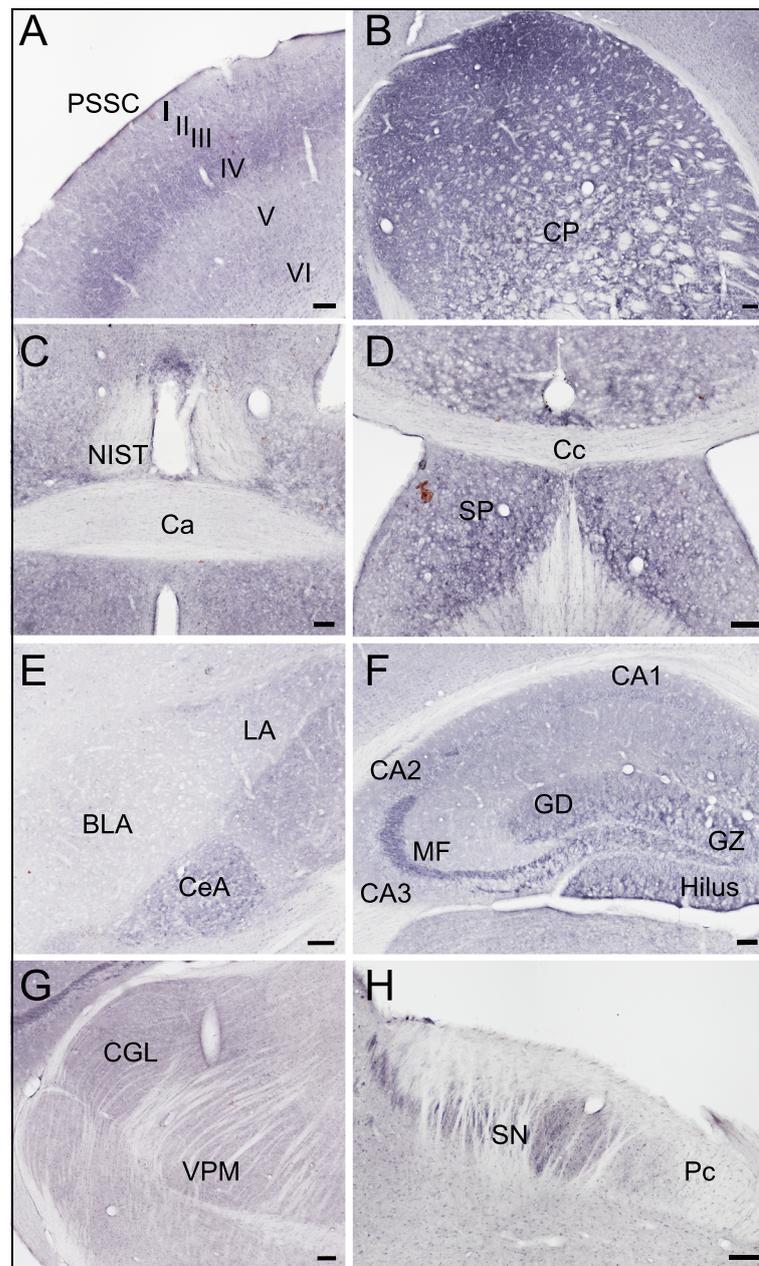


Abbildung 4.20: Detaillierte Expressionsanalyse transgener Ndr2

Eine genauere Betrachtung der immunohistochemisch gefärbten Hirnschnitte von CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg55}- und CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg89}-Mäusen zeigte eine starke Expression von EGFP-Ndr2 im Neuropil der inneren Körnerschicht (Schicht IV) des primären somatosensorischen Kortex (A) sowie mit einer geringeren Expression in den axonalen Faserbündeln der Commissura Anterior (C) und des Corpus Callosum (D). Im Hippokampus (F) hingegen war eine hohe Expression des Proteins in den Moosfaseraxonen zu beobachten. Aber auch in Schichten, in welchen die Dendriten der Körnerzellen (Stratum moleculare) und der CA1-Pyramidenzellen (Stratum radiatum, Stratum lacunosum-moleculare und Stratum oriens) liegen, zeigte sich eine Anreicherung der transgenen Ndr2-Kinase. Des Weiteren konnte das Fusionsproteins auch im Neuropil des Striatums (B) und des Thalamus (G) beobachtet werden. Eine Verteilung von EGFP-Ndr2 zeigte sich indes in den Zellkörpern des zentralen Subkerns der Amygdala (E) sowie in der Substantia nigra (H). Maßstab: A - H 100 μ m

suchte ich zunächst generell eine morphologische Veränderungen in der Ausprägung und Verteilung axonaler Faserbündel in den Tieren. Dies geschah mit einer systematischen Färbung von Myelin mithilfe der Black-Gold-Methode auf seriellen coronalen Schnitten durch das gesamte Gehirn.

In der Abbildung 4.21 sind jeweils drei coronale Schnitte unterschiedlicher Bereiche von CamKII-Cre/Ndr2^{lox/tg}-Tieren sowie von wt/Ndr2^{lox/tg}-Kontrolltieren zu sehen.

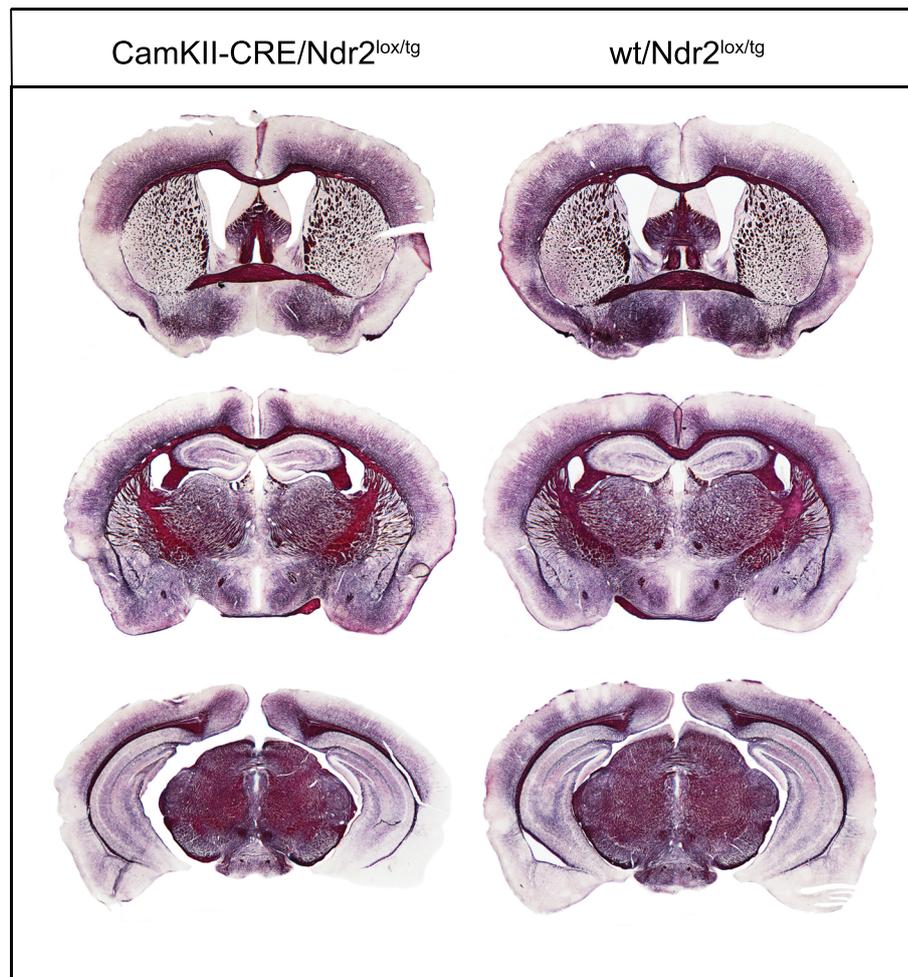


Abbildung 4.21: Axonale Fasern Ndr2-transgener Mäuse

In Hirnschnitten von CamKII-Cre/Ndr2^{lox/tg}- und wt/Ndr2^{lox/tg}-Tieren wurde mithilfe einer Black-Gold-Färbung die axonalen Fasern sichtbar gemacht. Ndr2-transgene Tiere wiesen im Vergleich zu Kontrolltieren keine Unterschiede in der Struktur sowie in der Dichte der axonalen Faserbündel der Commissura anterior und des Corpus callosums auf. Zudem konnte keine morphologischen Veränderungen der axonalen Fasern im Kortex, Striatum, Hippokampus, Amygdala, Thalamus und der Substantia nigra beobachtet werden.

Die Schnitte wurden ausgewählt, da sie repräsentativ jene Hirnregionen zeigen, in denen für beide Mauslinien eine prominente Expression transgener Ndr2-Kinase nachgewiesen wurde. Eine qualitative Betrachtung der Struktur sowie der Dichte von Axonen bzw. axonalen Faserbündeln zeigte jedoch keine Veränderung in CamKII-Cre/Ndr2^{lox/tg}-Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren. Eine eingehende Betrachtung der Commissura anterior und

des Corpus callosums wies keine Unterschiede in der Ausprägung und der Dicke beider Faserbündel auf. Auch konnte keine strukturellen Veränderung der axonalen Fasern im Kortex, Striatum, Hippokampus, Amygdala, Thalamus und der Substantia nigra beobachtet werden. Somit scheint die Induktion einer Überexpression von Ndr2 zu einem späten postnatalen Zeitpunkt zu keinen grundlegenden Veränderungen der Dichte und Verteilung axonaler Faserbündel in CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg}-Mäuse zu führen.

4.1.4.7 Im ventralen Hippokampus von CamKII-Cre/Ndr2^{lox/tg}-Mäusen ist die Dichte der Terminalien des suprapyramidalen Moosfaserbandes verringert

Aufgrund der hohen Expression von EGFP-Ndr2 in den hippocampalen Moosfasern von doppelt-transgenen Tieren und deren relativ späten postnatalen Entwicklung (Faulkner et al., 2007) untersuchte ich die Dichte dieser Faserbündel weiter im Detail. Die Axone der Körnerzellen des Gyrus dentatus teilen sich in die zwei Fasertrakte der suprapyramidalen sowie der intra-infrapyramidalen Moosfaserprojektionen auf. Mithilfe einer Timm-Silbersulfid-Färbung konnten die stark zinkhaltigen Terminalien der Moosfasern im Tier sichtbar gemacht werden (Schwegler et al., 1988b). Eine eingehende qualitative Betrachtung legte tatsächlich eine mögliche Veränderung des Moosfaserbandes nahe (siehe Abb. 4.23), so dass mithilfe der Leica QWin Software die Terminaliendichte der einzelnen Fasern als Fläche (Pixel/cm²) quantitativ analysierte wurde.

Eine univariate Varianzanalyse der erhobenen Daten bestätigte einen signifikanten Effekt ($F_{2,25} = 7,272$; $p = 0,004$) zwischen CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg}- und wt/Ndr2^{lox/tg}-Tieren in der Dichte der Terminalien des suprapyramidalen Bandes im ventralen Hippokampus (siehe Abb. 4.22).

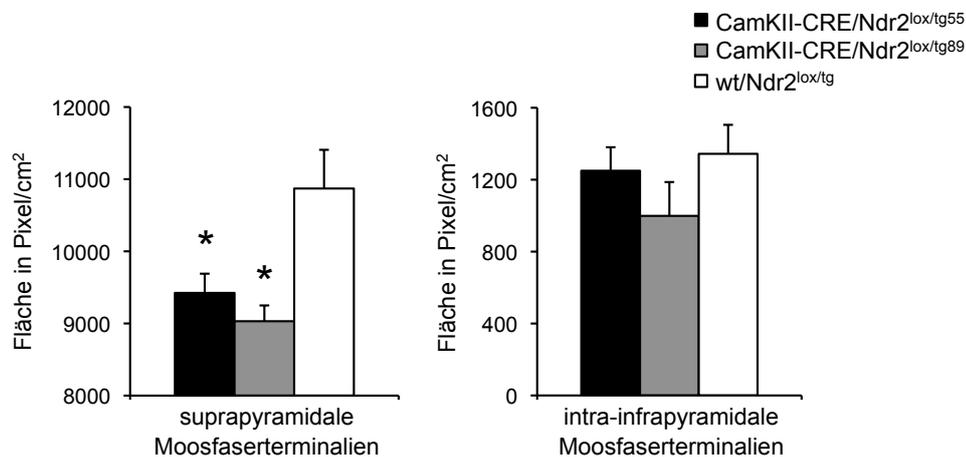


Abbildung 4.22: Reduktion der suprapyramidalen Moosfaserprojektionen in Ndr2-transgenen Mäusen

Eine Analyse der Terminaliendichte des suprapyramidalen- bzw. intra-infrapyramidalen Moosfaserbandes im ventralen Hippokampus von CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg55}- und CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg89}-Tieren zeigte, dass eine Überexpression von Ndr2 eine Reduktion der suprapyramidalen Moosfaserendigungen hervorrief. Hingegen zeigten CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg55}-Mäuse keine Veränderung in der Dichte der Terminalien des intra-infrapyramidalen Moosfaserbandes gegenüber Kontrolltieren. Die Werte sind dargestellt als MW ± SFM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ im Vergleich zu wt/Ndr2^{lox/tg}

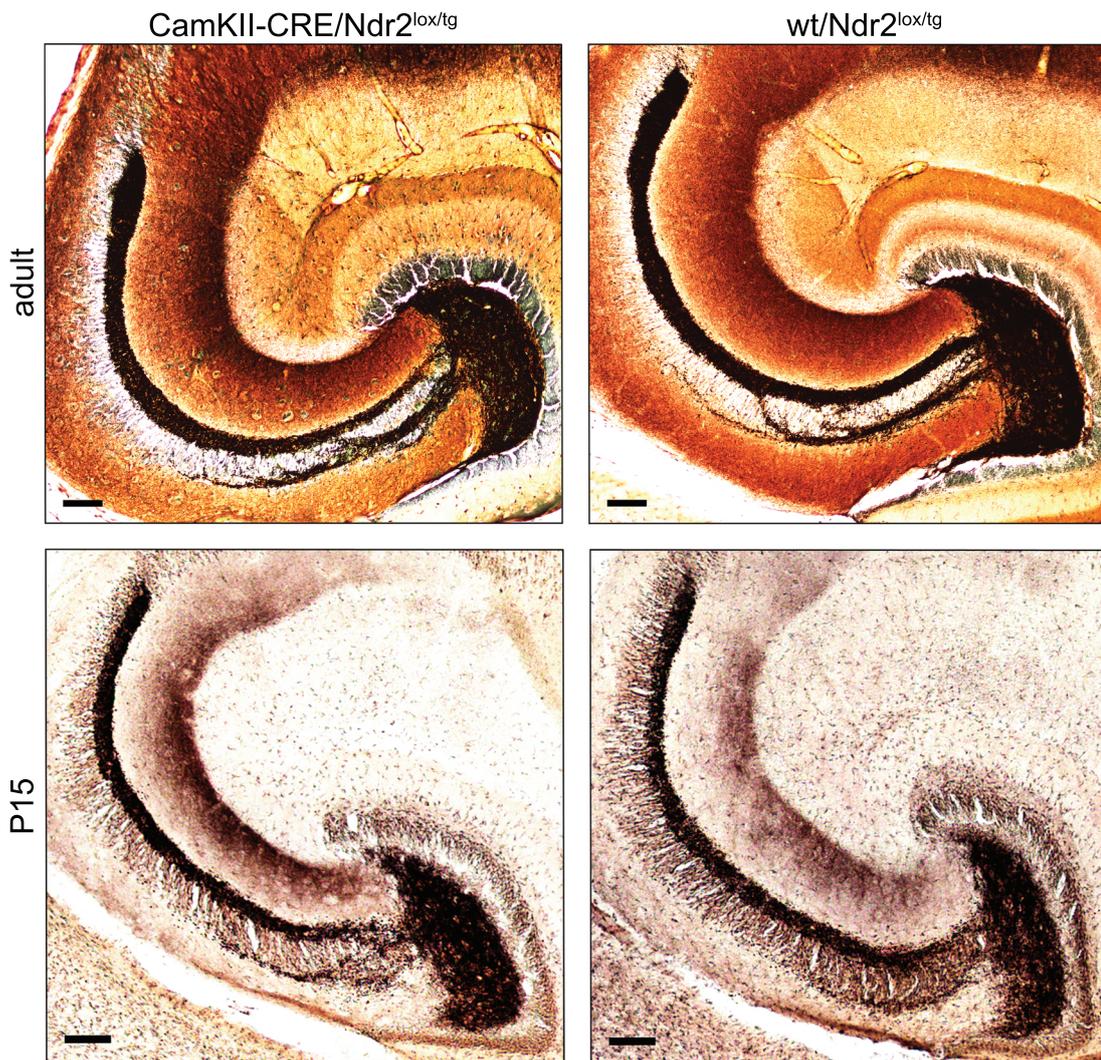


Abbildung 4.23: Hippokampale Moosfaserprojektionen in juvenilen und adulten Ndr2-transgenen Tieren

Juvenile (P15) CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg55}- und CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg89}-Tiere zeigten keine Veränderungen in der Ausprägung der Moosfaserterminalien im ventralen Hippokampus gegenüber P15-alten und wt/Ndr2^{lox/tg}-Kontrolltieren. Lediglich in adulten Mäusen konnte die bereits mit einer Dichteanalyse der Moosfaserterminalien im ventralen Hippokampus gezeigte Reduktion der suprapyramidalen Moosfaserendigungen in CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg}-Tieren gegenüber Kontrolltieren beobachtet werden. Anhand der Intensität der Färbung ist zu erkennen, dass die Ausprägung dieses Moosfaserbandes im Vergleich zu wt/Ndr2^{lox/tg}-Mäusen verringert war. Maßstab: A - D 100 μ m

Dabei zeigte eine paarweise Analyse der Daten im Detail, dass sowohl in CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg55}-Mäusen (Fischer's PLSD, $p = 0,01$) als auch in CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg89}-Mäusen ($p = 0,001$) die Terminaliendichte gegenüber wt/Ndr2^{lox/tg}-Kontrolltieren stark verringert war (CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg55}: $9423,69 \pm 266,06$ Pixel/cm², CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg89}: $9031,15 \pm 218,78$ Pixel/cm², wt/Ndr2^{lox/tg}: $10870,63 \pm 536,33$ Pixel/cm²). Hingegen konnte keine signifikante Veränderung ($F_{2,25} = 1,214$; $p = 0,316$) in der Terminaliendichte des intra-infrapyramidalen Moosfaserbandes im ventralen Hippokam-

pus von CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg55}- und CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg89}-Tieren gemessen werden (CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg55}: 1249,75 ± 130,66 Pixel/cm², CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg89}: 998,72 ± 188,09 Pixel/cm², wt/Ndr2^{lox/tg}: 1343,81 ± 161,22 Pixel/cm²).

Aufgrund der Verringerung der Dichte der suprapyramidalen Moosfaserterminalien in adulten CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg}-Mäusen stellte sich die Frage, ob diese Veränderung bereits schon während der embryonalen bzw. frühen postnatalen Entwicklung auftrat. Hierfür wurde in 15 Tage alten Mäusen ebenfalls mit der Timm-Silbersulfid-Färbung die hippocampalen Moosfaserprojektionen dargestellt. Es konnte jedoch keine Veränderung in der Ausprägung des suprapyramidalen Moosfaserbandes im ventralen Hippokampus der Tiere beobachtet werden (Abb. 4.23). Diese Beobachtung korrespondiert mit der von Minichiello et al. (1999) beschriebenen Cre-Rekombinase Expression der hier eingesetzten CamKII-CRE-transgenen Mäuse, die eine Expression transgener Ndr2 erst zu einem späten postnatalen (nach P15) Zeitpunkt ermöglicht.

4.1.5 Untersuchung der Abhängigkeit der Konsolidierung bzw. Rekonsolidierung eines tonabhängigen Furchtgedächtnisses von der Aktinfilamentdynamik

Während der Konsolidierung eines auditorischen Furchtgedächtnisses kommt es in der BLA von Mäusen zu einer Expressionserhöhung der β -Isoform des Zytoskelettproteins Aktin sowie der Serin/Threonin-Kinase Ndr2 (Stork et al., 2001; Stork et al., 2004). In zahlreichen vorhergehenden Studien konnte bereits gezeigt werden, dass eine Dynamik der Aktinfilamente in der Amygdala essentiell für die Bildung eines Furchtgedächtnisses ist (siehe Kapitel Einleitung Abs. 1.2.2). Jedoch wurde die genaue zeitliche Abhängigkeit einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts während der Konsolidierungsphase noch nicht gezeigt. Darüber hinaus wurde bislang nicht untersucht, ob eine Veränderung der Struktur des Aktinzytoskeletts ebenfalls eine funktionelle Relevanz für die Rekonsolidierung eines Furchtgedächtnisses in der Amygdala hat.

Im folgenden Teil dieser Arbeit untersuchte ich daher, welche Bedeutung die Dynamik des Aktinzytoskeletts in der Gedächtnisbildung hat und in welchem Zeitfenster nach dem Training bzw. nach dem ersten Abruf des Furchtgedächtnisses eine Blockierung der Depolymerisierung von Aktinfilamenten Einfluss auf die Gedächtniskonsolidierung bzw. -rekonsolidierung nimmt. Dafür wurde das Zytotoxin des grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*) Phalloidin über Führungskanülen intracranial in den basolateralen Kern der Amygdala bilateral injiziert. Phalloidin ist ein bizyklisches Peptid und bindet mit gleicher Affinität an kurze und lange Aktinfilamente in einem stöchiometrischen Verhältnis von einem Phalloidinmolekül pro Aktinuntereinheit. Phalloidin bindet nicht an globuläres Aktin (Vandekerckhove et al., 1985). Durch die Bindung an Aktinfilamente, verhindert das Peptid deren Depolymerisation und führt zu einer Stabilisierung der Aktinfilamentstruktur (Cooper, 1987).

Das für diese Studie eingesetzte Phalloidin lag gekoppelt mit dem Fluophor Rhodamin vor und wurde in 10 % DMSO gelöst in die BLA appliziert. Kontrolltieren wurde eine Vehikellösung mit 10 % DMSO injiziert. Wie bereits zuvor in der Literatur beschrieben ist von dieser prozentualen Menge an DMSO kein Effekt auf das Verhalten der Versuchstiere zu erwarten (Varma et al., 1987). Um mögliche unmittelbare Effekte der intraamygdalären Injektion ausschließen zu können, wurde das Furchtgedächtnis erst nach einer Woche getestet. Eine histologische Untersuchung zeigte anhand einer Nissl-Färbung in allen Tieren

eine intakte Gewebestruktur um die beiden Injektionsstellen herum. In der Abbildung 4.24 ist eine Zusammenfassung der Positionen der Injektionsstellen der 102 behandelten Tiere, in denen entweder die Konsolidierung oder die Rekonsolidierung des Furchtgedächtnisses getestet wurde, dargestellt.

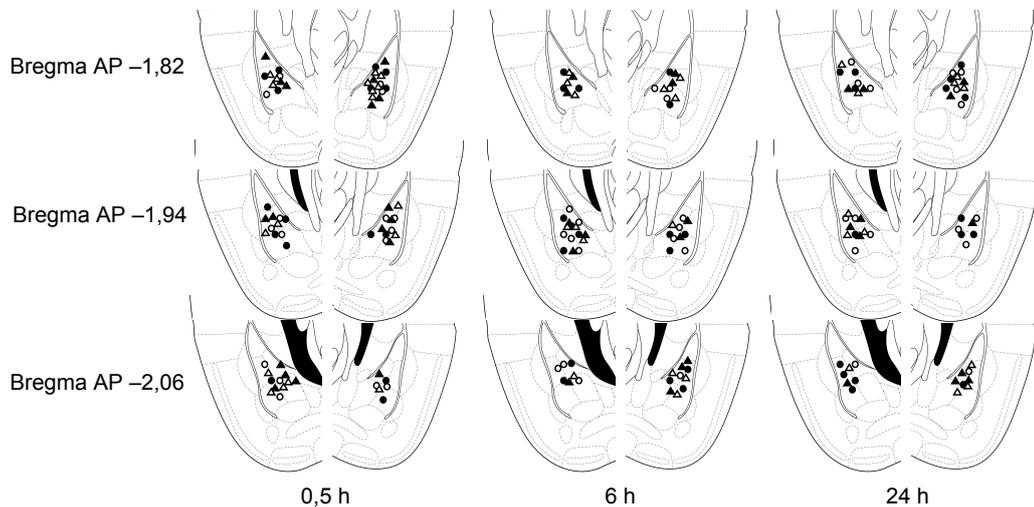


Abbildung 4.24: Graphische Darstellung der Kantülenpositionen

Für eine pharmakologische Behandlung mit einer Phalloidinlösung (schwarz markiert) bzw. einer Vehikellösung (weiß markiert) wurden adulten männlichen Mäusen eine Führungskanüle in die BLA beider Hemisphären implantiert. Die graphische Darstellung zeigt die Positionen aller Kanülen der 102 Tiere die entweder eine Injektion nach dem Training (mit Kreisen markiert) oder nach dem ersten Gedächtnisabruf (Abruf 1) erhalten hatten (mit Dreiecken markiert).

4.1.5.1 Innerhalb einer spezifischen Phase der Konsolidierung bzw. Rekonsolidierung ist eine Dynamik des Aktinzytoskeletts essentiell für die Bildung eines Furchtgedächtnisses

Um die zeitliche Spezifität der Aktinzytoskelettdynamik während der Gedächtniskonsolidierung bzw. -rekonsolidierung zu untersuchen, wurden Mäusen zu den Zeitpunkten 0,5 h, 6 h und 24 h nach dem Training bzw. nach dem ersten Abruf eine Phalloidinlösung bzw. Vehikellösung bilateral in die basolaterale Amygdala injiziert.

Mit einer multivariaten Varianzanalyse konnte ein signifikanter Effekt der Phalloidin-Injektion gegenüber Vehikel-injizierten Kontrollen (CS^+ : $F_{1,80} = 7,689$; $p = 0,007$; CS^- : $F_{1,80} = 5,732$; $p = 0,019$) sowie eine signifikante Interaktion dieses Effektes mit dem Zeitpunkt der Injektion (0,5 h, 6 h, 24 h) für das tonabhängige (CS^+ : $F_{2,80} = 3,771$; $p = 0,027$) und das generalisierte Furchtgedächtnis (CS^- : $F_{2,80} = 4,294$; $p = 0,017$) detektiert werden. Dies geschah unabhängig von der spezifischen Gedächtnisphase (Konsolidierung/Rekonsolidierung, $p > 0,61$ n.s.). Indessen zeigte sich kein Effekt der Behandlung und keine Interaktion von Phalloidin-Injektion und Zeitpunkt für das kontextuelle Furchtgedächtnis (Kontext, $p = 0,065$ n.s.). Allerdings konnte hier eine signifikante Interaktion zwischen der Injektion und der Gedächtnisbildungsphase beobachtet werden ($F_{1,80} = 5,664$; $p = 0,02$). Aufgrund dieser Befunde wird in den folgenden Abschnitten detaillierter die Bedeutung der Phalloidin-Injektionen in die BLA an unterschiedlichen

Zeitpunkten nach dem Training bzw. dem ersten Abruf des Furchtgedächtnisses (0,5 h, 6 h und 24 h) auf die tonabhängige und generalisierte Furchtgedächtnisbildung analysiert, während für das kontextuelle Furchtgedächtnis der differenzielle Einfluss einer Behandlung mit Phalloidin auf die Konsolidierung und Rekonsolidierung betrachtet wird.

4.1.5.2 Eine Behandlung mit Phalloidin 6 h nach dem Training bzw. dem Gedächtnisabruf beeinträchtigte die Konsolidierung und Rekonsolidierung des tonabhängigen Furchtgedächtnisses

Eine Betrachtung des Furchtverhaltens auf den konditionierten Stimulus (Abb. 4.25) während des ersten und zweiten Gedächtnisabrufs zeigte, dass eine Blockade der Dynamik des Aktinzytoskelettes mit Phalloidin 6 h nach dem Lernstimulus die Konsolidierung und Rekonsolidierung des tonabhängigen Furchtgedächtnisses beeinträchtigte, was sich in einer verringerten Furchtantwort der Tiere auf den CS⁺ im Vergleich zur Vehikelgruppe darstellte.

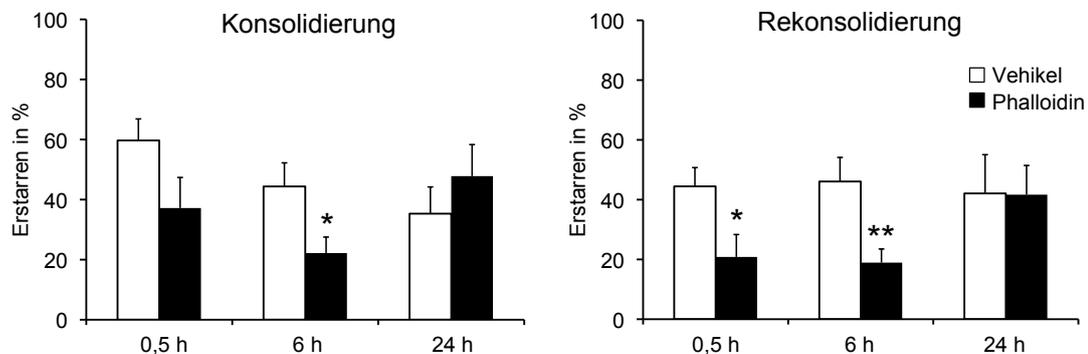


Abbildung 4.25: Phalloidin-Injektionen vermindern die Konsolidierung und Rekonsolidierung der Furchtantwort auf den CS⁺

Eine Blockade der Dynamik des Aktinzytoskelettes in der BLA, induziert durch eine Injektion mit Phalloidin 6 h nach dem Training bzw. 0,5 h und 6 h nach dem ersten Gedächtnisabruf, führte zu einer verringerten Furchtantwort während einer erneuten Präsentation des CS⁺. Hingegen führte eine Injektion zum Zeitpunkt 24 h zu keiner Beeinträchtigung der Konsolidierung und Rekonsolidierung des tonabhängigen Furchtgedächtnisses im Vergleich zur Vehikelgruppe. Die Werte sind dargestellt als MW ± SFM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ im Vergleich zu der gepaarten Vehikelgruppe

Eine univariate Varianzanalyse bestätigte, dass eine Phalloidin-Behandlung während der Zeitpunkte 0,5h ($F_{1,34} = 7,408$; $p = 0,011$) und 6h ($F_{1,30} = 13,636$; $p = 0,001$), aber nicht während des 24 Stunden-Zeitpunktes ($F_{1,28} = 0,324$; $p = 0,574$ n.s.), das tonabhängige Furchtgedächtnis signifikant beeinflusste. Dabei konnte für alle drei Zeitpunkte kein Unterschied zwischen der Konsolidierung und der Rekonsolidierung des tonabhängigen Furchtgedächtnisses durch eine Behandlung mit Phalloidin beobachtet werden. Eine genauere Betrachtung der Daten belegte eine signifikante Reduktion des Furchtverhaltens, wenn Phalloidin 6h nach dem Training (Phalloidin: $22,19 \pm 7,86$ Vehikel: $44,38 \pm 5,33$; Fischer's PLSD, $p = 0,022$), also während der Konsolidierungsphase appliziert wurde. Auch Injektionen in der Rekonsolidierungsphase, 0,5h (Phalloidin: $20,83 \pm 7,5$ Vehikel: $44,44 \pm 6,28$; $p = 0,039$) oder 6 h (Phalloidin: $18,92 \pm 4,56$ Vehikel: $46,07 \pm 8,07$; $p = 0,01$) nach dem ersten Abruf des Furchtgedächtnisses, hatten einen solchen Effekt.

Eine Behandlung mit Phalloidin 0,5h (Phalloidin: $37,19 \pm 10,18$ Vehikel: $59,69 \pm 7,17$; $p = 0,078$) oder 24 h nach dem Training (Phalloidin: $47,81 \pm 10,50$ Vehikel: $35,31 \pm 8,90$; $p = 0,377$ n.s.) bzw. 24 h nach dem ersten Abruf (Phalloidin: $41,67 \pm 9,78$ Vehikel: $42,08 \pm 12,96$; $p = 0,979$ n.s.) hatte indes keinen Einfluss auf das Furchtgedächtnis.

4.1.5.3 Phalloidin-behandelte Tiere zeigten innerhalb der vier Präsentationen keine keine Gewöhnung an den CS⁺

Um eine mögliche Gewöhnung der 6 h nach dem Training bzw. ersten Abruf mit Phalloidin behandelten Tiere an den CS⁺ ausschließen zu können, wurden die Werte der Furchtantwort für alle vier Stimuluspräsentationen (Abb. 4.26) mit einer univariaten Varianzanalyse für wiederholte Messungen gezielt weiter analysiert. Dabei stellten die einzelnen Präsentationen des CS⁺ („CS⁺1“, „CS⁺2“, „CS⁺3“, „CS⁺4“) die Innersubjektfaktoren und der Zwischensubjektfaktor Behandlung die Phalloidin- oder Vehikelgruppe dar. Hier zeigte sich für die Konsolidierung des tonabhängigen Furchtgedächtnisses, dass eine Behandlung mit Phalloidin signifikant die Ausprägung des Furchtverhaltens beeinflusste ($F_{1,14} = 5,456$; $p = 0,035$), die wiederholte Präsentation des CS⁺ ($F_{3,42} = 0,437$; $p = 0,727$ n.s.) jedoch keinen Effekt hatte. Auch zeigte sich keine Interaktion zwischen der Behandlung und den Stimuluspräsentationen ($F_{3,42} = 0,96$; $p = 0,420$ n.s.). Für die Rekonsolidierung des tonabhängigen Furchtgedächtnisses konnte indes eine Gewöhnung an den CS⁺ beobachtet werden. Diese war aber gleich für beide Behandlungsgruppen, da sich keine Interaktion zwischen der Behandlung und den Stimuluspräsentationen zeigte ($F_{3,36} = 0,196$; $p = 0,899$ n.s.). Neben einer Behandlung mit Phalloidin ($F_{1,12} = 8,574$; $p = 0,013$) beeinflussten auch die einzelnen Präsentationen des CS⁺ signifikant die Rekonsolidierung des tonabhängigen Furchtgedächtnisses ($F_{3,36} = 4,339$; $p = 0,01$).

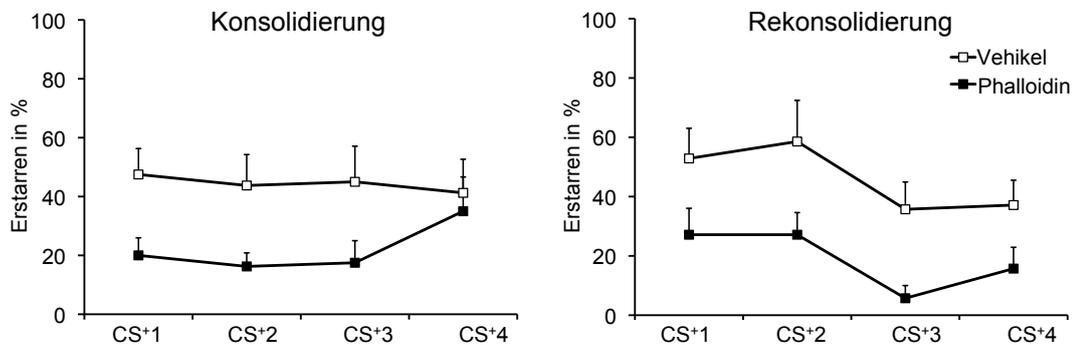


Abbildung 4.26: Furchtantwort auf die einzelnen Präsentationen des CS⁺

Tiere die eine Phalloidin- bzw. Vehikel-Injektion 6 h nach dem Training erhalten hatten, zeigten keine Veränderung in der Ausprägung ihrer Furchtantwort während der vier hintereinander folgenden Präsentationen des CS⁺ (CS⁺1, CS⁺2, CS⁺3, CS⁺4). Hingegen konnte während des zweiten Abrufs des Furchtgedächtnisses eine Reduktion der Furchtantwort nach der Präsentation des CS⁺2 für Phalloidin- bzw. Vehikel-behandelte Tiere beobachtet werden. Aufgrund der Verminderung der Furchtantwort in beiden Behandlungsgruppen, konnte auch während des 2. Abrufs des Furchtgedächtnisses eine Gewöhnung an den Stimulus CS⁺ durch eine Behandlung mit Phalloidin ausgeschlossen werden. Die Werte sind dargestellt als MW \pm SFM.

4.1.5.4 Eine Behandlung mit Phalloidin zeigte einen Effekt innerhalb der frühen Konsolidierungs- bzw. Rekonsolidierungsphase des generalisierten tonabhängigen Furchtgedächtnisses

Eine univariate Varianzanalyse zeigte eine signifikante Beeinträchtigung des Furchtverhaltens auf den CS⁻ (Abb. 4.27), wenn Phalloidin zum Zeitpunkt 0,5 h ($F_{1,34} = 18,713$; $p = 0,000$) nach dem Training bzw. nach dem ersten Abruf des Furchtgedächtnisses in die BLA appliziert wurde. Eine Injektion zu den späteren Zeitpunkten 6 h ($F_{1,30} = 1,150$; $p = 0,293$ n.s.) und 24 h ($F_{1,28} = 0,170$; $p = 0,684$ n.s.) hatte jedoch keinen Einfluss auf die Konsolidierung bzw. Rekonsolidierung des generalisierten Furchtgedächtnisses. Wie für das tonabhängige Furchtgedächtnis konnte für alle drei Injektionszeitpunkte kein Unterschied zwischen der Konsolidierung und der Rekonsolidierung des Furchtgedächtnisses beobachtet werden. Eine genauere Betrachtung der Daten der Ausprägung des Furchtgedächtnisses zeigte, dass die Furchtantwort auf den CS⁻ signifikant reduziert war, wenn Phalloidin 0,5 h nach dem Training (Phalloidin: $17,50 \pm 4,43$ Vehikel: $46,56 \pm 7,33$; Fischer's PLSD, $p = 0,007$) bzw. nach dem ersten Gedächtnisabruf (Phalloidin: $6,67 \pm 2,86$ Vehikel: $37,78 \pm 10,27$; $p = 0,003$) injiziert wurde, jedoch nicht zu den späteren Zeitpunkten 6 h ($p > 0,080$) und 24 h ($p > 0,198$). Diese Ergebnisse zeigen wie eine Inhibierung der Dynamik des Aktinzytoskelettes innerhalb einer frühen Konsolidierungs- bzw. Rekonsolidierungsphase zu einer Beeinflussung des generalisierten tonabhängigen Furchtgedächtnisses führt.

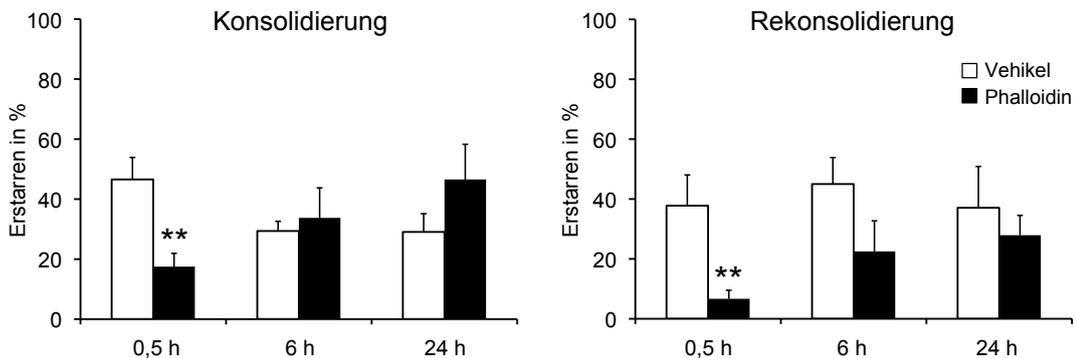


Abbildung 4.27: Phalloidin-Injektionen vermindern die Furchtantwort auf den CS⁻

Phalloidin-behandelte Tiere zeigten eine reduzierte Furchtantwort auf den CS⁻, wenn eine Injektion dreißig Minuten nach dem Training bzw. nach dem ersten Abruf erfolgte, jedoch nicht zu den späteren Zeitpunkten 6 h und 24 h. Somit beeinträchtigt eine Inhibierung der Aktinzytoskelettdynamik die Bildung des generalisierten tonabhängigen Furchtgedächtnisses nur innerhalb einer frühen Konsolidierungs- bzw. Rekonsolidierungsphase. Die Werte sind dargestellt als MW ± SFM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ im Vergleich zu der gepaarten Vehikelgruppe

4.1.5.5 Phalloidin beeinflusste das kontextuelle Furchtgedächtnis nur in einer frühen Phase der Rekonsolidierung

Eine univariate Varianzanalyse zeigte für die Ausprägung eines Furchtverhaltens auf den Hintergrundkontext (Abb. 4.28), d.h. die Umgebung in welcher die Konditionierung auf den Tonstimulus CS⁺ erfolgte, dass dieses nur während der Rekonsolidierung ($F_{1,44} =$

8,877; $p = 0,005$), nicht aber während der Konsolidierung ($F_{1,48} = 0,142$; $p = 0,708$ n.s.) des Furchtgedächtnisses durch eine Injektion mit Phalloidin in die BLA beeinträchtigt wurde. Eine paarweise Analyse der Gruppen zeigte eine Reduktion der Furchtantwort auf den Kontext, wenn Phalloidin 0,5 h nach dem ersten Abruf (Phalloidin: $10,46 \pm 2,81$ Vehikel: $38,80 \pm 7,11$; Fischer's PLSD, $p = 0,001$) in die BLA appliziert wurde. Eine Behandlung mit Phalloidin während der späteren Zeitpunkte 6 h (Phalloidin: $19,52 \pm 7,77$ Vehikel: $30,95 \pm 3,97$; $p = 0,242$ n.s.) und 24 h (Phalloidin: $28,75 \pm 4,99$ Vehikel: $37,36 \pm 11,18$; $p = 0,413$ n.s.) hatte indes keinen Effekt. Somit führte eine Blockade der Aktinzytoskelettdynamik während eines frühen Zeitpunktes der Rekonsolidierung zu einer Beeinträchtigung des kontextuellen Furchtgedächtnisses.

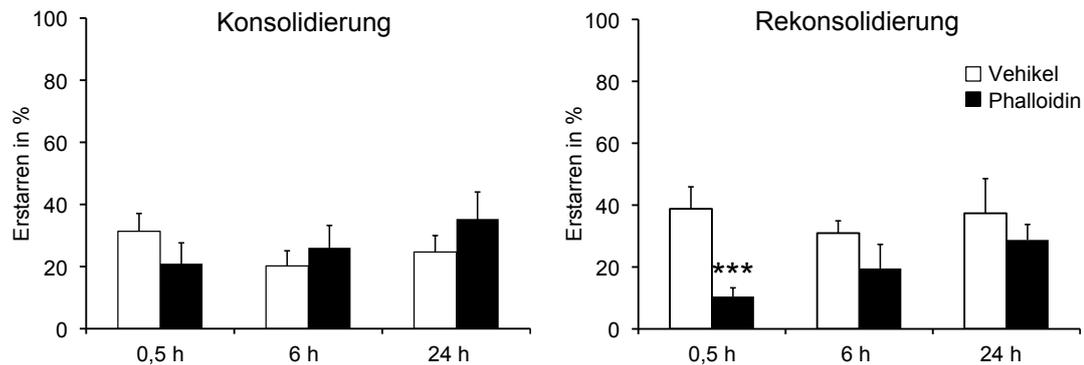


Abbildung 4.28: Spezifische Wirkung von Phalloidin-Injektionen auf die Rekonsolidierung des Hintergrundkontextgedächtnisses

Tiere, die 0,5 h, 6 h und 24 h nach dem Training eine Phalloidin-Injektion erhielten, zeigten keine Veränderung in ihrer Furchtantwort auf den Hintergrundkontext im Vergleich zu Tieren der Vehikelgruppe. Jedoch konnte ein reduziertes Ausprägung des Furchtverhaltens Erstarren in Tieren beobachtet werden, wenn diese 0,5 h nach dem ersten Gedächtnisabruf mit Phalloidin behandelt wurden. Somit hatte eine durch Phalloidin induzierte Blockade der Dynamik des Aktinzytoskelettes in der BLA lediglich einen Einfluss auf eine frühe Phase der Rekonsolidierung, nicht aber auf die Konsolidierung des kontextuellen Furchtgedächtnisses. Die Werte sind dargestellt als MW ± SFM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ im Vergleich zu der gepaarten Vehikelgruppe

4.1.5.6 Phalloidin-behandelte Tiere zeigten keine Veränderung des angstähnlichen Verhaltens in einem Erhöhten-Plus-Labyrinth-Test

Mithilfe eines Erhöhten-Plus-Labyrinths wurde das angstähnliche Verhalten von Mäusen überprüft, die eine Injektion von Phalloidin- bzw. einer Vehikellösung in die basolaterale Amygdala 6 h nach dem Training erhalten hatten (Abb. 4.29). Wie anhand der Gesamtzahl der Begehungen aller Arme und Begehungen der offenen Arme im prozentualen Verhältnis zur Gesamtzahl zu sehen ist, zeigten Phalloidin-behandelte Tiere weder eine veränderte Aktivität noch ein gesteigertes angstähnliches Verhalten gegenüber Vehikel-behandelter Tiere (Gesamtzahl aller Begehungen: Phalloidin: $15,40 \pm 2,42$ Vehikel: $14,20 \pm 2,76$; $p = 0,752$; Begehungen der offenen Arme (%): Phalloidin: $56,75 \pm 7,72$ Vehikel: $54,01 \pm 11,88$; $p = 0,852$).

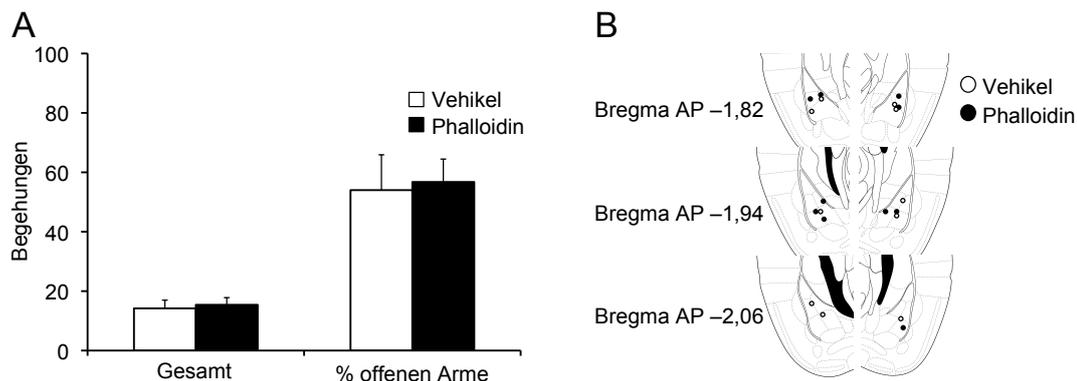


Abbildung 4.29: Phalloidin-behandelte Tiere weisen ein unverändertes Angstverhalten in einem Erhöhten-Plus-Labyrinth auf

A Mäuse die 6 h nach dem Training eine Phalloidin-Injektion in die BLA erhielten hatten, zeigten in einem Erhöhten-Plus-Labyrinth-Test im Vergleich zu Vehikel-behandelten Tieren weder eine Veränderung der lokomotorischen Aktivität (angezeigt durch die Anzahl der Begehungen aller Arme) noch ihres angstähnlichen Verhaltens (angezeigt durch das prozentuale Verhältnis der Begehungen der offenen Arme). Die Positionen der bilateral in die BLA implantierten Kanülen aller im Erhöhten-Plus-Labyrinth getesteten Tiere sind in der Abb. 4.29 **B** schematisch wiedergegeben. Werte sind dargestellt als MW \pm SFM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ im Vergleich zu der gepaarten Vehikelgruppe

4.1.6 Biochemische und histochemische Untersuchung der Integration von Phalloidin in die Zelle und dessen intrazelluläre Wirkung auf die Stabilität der Aktinfilamente

4.1.6.1 Phalloidin erhöhte zwei Stunden nach der Injektion den Gehalt an F-Aktin in den Zellen

Durch unterschiedliche Präzipitationsschritte konnte aus dem Gewebe des basolateralen Unterkernes der Amygdala (BLA) das hoch verzweigte F-Aktin (HV F-Aktin) und das schwach verzweigte F-Aktin (SV F-Aktin) von dem globulären Aktin (G-Aktin) getrennt werden und dessen Gehalt in den einzelnen Fraktionen untersucht werden (siehe Abb. 4.30 A). Dabei zeigte sich im Vergleich zu Vehikel-injiziertem Kontrollgewebe, dass sich der Gehalt an HV F-Aktin, SV F-Aktin und G-Aktin im Gewebe der BLA von Tieren, welche 10 min, 30 min oder 6 h zuvor mit einer Phalloidin-Injektion behandelt wurden, nicht unterschied. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass für beide Behandlungen (Phalloidin und Vehikel) der Gehalt an hoch verzweigten (HV) sowie schwach verzweigten (SV) F-Aktin viel geringer war als der Gehalt an G-Aktin. Eine Aufreinigung des Gewebes zwei Stunden nach einer Phalloidin-Injektion zeigte jedoch eine deutliche Zunahme des Gehaltes an hoch verzweigtem F-Aktin (HV) in der BLA im Vergleich zu der Kontrollfraktion. Da eine Aufreinigung der einzelnen Aktinfraktionen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten nach einer Vehikel-Injektion in die BLA keine Veränderung im Gehalt an HV F-Aktin, SV F-Aktin und G-Aktin zeigte, wurden in der Abbildung 4.30 A nur die Ergebnisse des 2 h Zeitpunktes dargestellt, da zu diesem Zeitpunkt eine Blockierung der Depolymerisation von Aktinfilamenten durch Phalloidin beobachtet wurde.

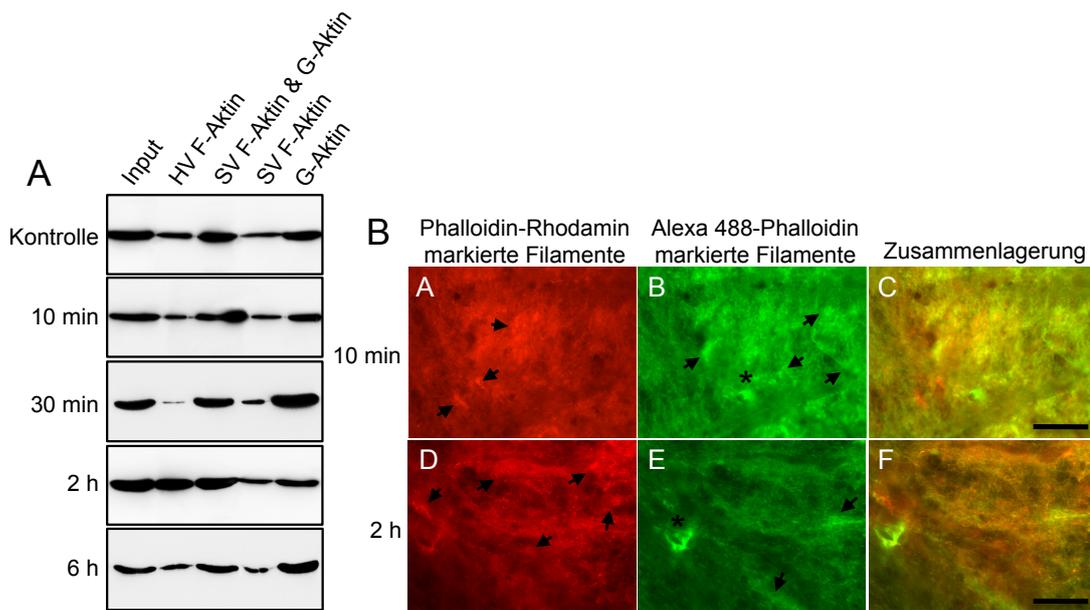


Abbildung 4.30: Zeitliche Analyse der Wirkung von Phalloidin

A Mithilfe unterschiedlicher Zentrifugationsgeschwindigkeiten wurde zelluläres Aktin in hoch verzweigtes F-Aktin (HV F-Aktin), schwach verzweigtes F-Aktin (SV F-Aktin) und globuläres Aktin (G-Aktin) aufgetrennt. Dabei konnte zu den Zeitpunkten 10 min, 30 min und 6 h nach einer Injektion mit Phalloidin in der BLA keine Veränderungen in dem Gehalt an HV F-Aktin, SV F-Aktin und G-Aktin im Vergleich zu Vehikel-injizierten Kontrollgewebe beobachtet werden. Jedoch zeigte eine Aufreinigung des Gewebes 2 h nach einer Phalloidin-Injektion im Vergleich zu der Kontrollfraktion eine Erhöhung des Gehaltes an hoch verzweigtem F-Aktin in der BLA. **B** Zehn Minuten nach einer Phalloidin-Rhodamin-Injektion konnte auf zellulärer Ebene beobachtet werden, dass Phalloidin-Rhodamin bereits gebunden an Aktinfilamente (**A**) vorlag. Jedoch zeigte sich anhand einer Färbung mit Alexa 488-gekoppelten Phalloidin (**B**), dass zu diesem Zeitpunkt viele Bereiche des Gewebes nur mit Alexa 488-gekoppelten Phalloidin und nur wenige mit Phalloidin-Rhodamin (**A**) markiert waren (siehe Pfeile). Darüber hinaus wies eine hohe Überlappung beider farbstoffgekoppelter Phalloidine (**C**) darauf hin, dass die Aktinfilamente nur teilweise mit Phalloidin-Rhodamin gebunden vorlagen und somit Alexa 488-gekoppeltes Phalloidin sich zusätzlich anlagern konnte. Zwei Stunden nach einer Phalloidin-Rhodamin-Injektion konnte allerdings nur noch ein schwaches Fluoreszenzsignal des mit Alexa 488-gekoppelten Phalloidins (**E**) beobachtet werden. Somit lag Phalloidin-Rhodamin zu diesem Zeitpunkt an fast alle Aktinfilamente (**D** & **F**) gebunden vor. Diese Beobachtung bestätigte die biochemischen Befunde über den Zeitpunkt der zellulären Wirkung von Phalloidin auf die Polymerisation/Depolymerisation der Aktinfilamente. Maßstab: A - F 20 μm

4.1.6.2 Phalloidin bindete bereits 10 min nach der Injektion an Aktinfilamente

Um zu überprüfen wie schnell und effizient Phalloidin nach einer Injektion in die Zellen der BLA aufgenommen wurde und an das intrazelluläre Aktinzytoskelett gebunden vorlag, wurden Hirnschnitte von Tieren nach einer Phalloidin-Rhodamin-Injektion mit Alexa 488-gekoppelten Phalloidin gefärbt. Aktinfilamente, die zuvor nicht mit dem im roten Wellenlängenbereich emittierenden Phalloidin-Rhodamin gesättigt wurden, konnten nun mit dem im grünen Bereich emittierenden Alexa 488-gekoppelten Phalloidin markiert

werden. Es zeigte sich, dass bereits 10 min nach der Injektion Phalloidin an Aktinfilamenten gebunden vorlag. Es war jedoch nur ein gewisser Teil des F-Aktins in den Zellen mit Phalloidin-Rhodamin markiert da, wie in der Abbildung 4.30 B gut zu erkennen ist, viele Bereiche des Gewebes entweder nur mit Alexa 488-gekoppelten Phalloidin markiert waren oder mit dem Fluoreszenzsignal von Phalloidin-Rhodamin eine Überlappung zeigten. Im Vergleich dazu konnte zwei Stunden nach der Injektion nur noch ein schwaches Fluoreszenzsignal mit Alexa 488-gekoppelten Phalloidin beobachtet werden. Somit lagen zu diesem Zeitpunkt fast alle Aktinfilamente mit Phalloidin-Rhodamin gebunden vor. Diese Beobachtung bestätigte die biochemischen Befunde, dass Phalloidin zu diesem Zeitpunkt massiv auf die Dynamik des Aktinzytoskeletts einwirkt.

Kapitel 5

Diskussion

Anhand der Untersuchungen im Rahmen meiner Doktorarbeit konnte ich belegen, dass die murine Ndr2-Kinase, ähnlich wie dies bereits für ihre Invertebratenhomologe beschrieben worden ist, die Verzweigung der Dendriten und das Auswachsen der Axone von Neuronen reguliert. Darüber hinaus konnte ich nachweisen, dass Ndr2 diese Differenzierungsprozesse über eine Regulation der Integrin-abhängigen Zelladhäsion beeinflusst. Die Erhöhung aktivierten β 1-Integrins in auswachsenden Strukturen sowie die Assoziation der Kinase mit dem Endozytose/Exozytose-Signalweg der Integrine legen nahe, dass Ndr2 die Aktivität der Zelladhäsionsmoleküle über einen intrazellulären Transport und über eine mögliche Beteiligung an einem *inside-out*-Signalweg reguliert und so das Auswachsen von Dendriten und Axonen im sich entwickelnden Nervensystem kontrolliert. Mit der Generierung und Charakterisierung von konditional transgenen Mäusen gelang mir der Nachweis einer solchen Ndr2-Funktion im hippocampalen Moosfasersystem *in vivo* und die Erstellung eines Modells für die Untersuchung komplexer Ndr2-vermittelter neuronaler Funktionen, zum Beispiel im Rahmen der Gedächtnisbildung.

5.1 Die Serin/Threonin-Kinase Ndr2 reguliert während der Entwicklung das Auswachsen und die Verzweigung von Dendriten und Axonen

Während der Entwicklung des zentralen Nervensystems werden viele der morphologischen Differenzierungsvorgänge von Neuronen wie beispielsweise das initiale Auswachsen von Neuriten, die nachfolgende Elongation der Axone und die Verzweigung der Dendriten über Proteinkinasen reguliert, deren Aktivierung wiederum im Rahmen komplexer Signalkaskaden koordiniert wird. Die in *D. melanogaster* vorkommenden Ndr-Kinasen Tricornered und Warts, sowie die in *C. elegans* vorkommende Kinase SAX-1 sind Homologe der Serin/Threonin-Kinase Ndr2. Für diese Kinasen konnte bereits eine wichtige Rolle in der Differenzierung von Neuronen, insbesondere in der Kontrolle des Auswachsens und des Verzweigens der Dendriten, nachgewiesen werden (Hergovich et al., 2006). Mutationsstudien in *D. melanogaster* offenbarten, dass Tricornered über die Prozesse *tiling* und *self-avoidance* die Ausbreitung der Dendriten kontrolliert, da ein vollständiger funktioneller Verlust der Kinase eine Erhöhung der dendritischen Verzweigung induzierte. Warts hingegen reguliert die Aufrechterhaltung der dendritischen Felder sensorischer

Neurone, da ein Verlust der Funktion von Warts einerseits zu einer Reduktion der Verzweigungen und andererseits zu einer Verkürzung der Dendriten führte (Emoto et al., 2004; Emoto et al., 2006).

5.1.1 Ndr2 kontrolliert über eine Regulation der Aktivität von Integrinen das Wachstum und die Verzweigung der Dendriten in Neuronen

In dieser Studie konnte ich in akut transfizierten hippocampalen Primärneuronen beobachten, dass eine Überexpression von Ndr2 die Verzweigung der Dendriten erhöhte, wohingegen eine Inhibierung der endogenen Expression der Ndr2-Kinase das Dendritenwachstum sowie die Dendritenverzweigung massiv reduzierte. Demzufolge wird die Ausbildung der Dendritenbäume von Neuronen auch in Säugetieren über eine Ndr-Kinase kontrolliert. Aufgrund der gleichartigen Effekte der funktionellen Verluste von Warts und Ndr2 in Bezug auf die Verzweigung von Dendriten ist zu vermuten, dass Ndr2 ähnlich wie Warts in der Fruchtfliege einen entscheidenden Anteil an der Aufrechterhaltung der dendritischen Felder von Neuronen im zentralen Nervensystem von Säugetieren hat. Gleichzeitig gilt es jedoch zu beachten, dass die beiden untersuchten Modelle nicht ohne weiteres ineinander überführt werden können. So ist die Funktion der aus der Fliege *D. melanogaster* stammenden Ndr-Kinase Warts anhand sensorischer Neuronen eines adulten und vergleichsweise einfachen Organismus untersucht worden, wohingegen die funktionelle Rolle von Ndr2 bei der Verzweigung von Dendriten in Kulturen dissoziierter, unreifer hippocampaler Primärneuronen des murinergen ZNS analysiert worden ist.

In der Entwicklung des zentralen Nervensystems wird die Differenzierung der Neurone wie das Auswachsen und die Verzweigung der Dendriten über extrazelluläre Stimuli und intrazellulär ablaufenden Signalkaskaden koordiniert. Innerhalb dieser morphologischen Wachstumsprozesse üben die Zelladhäsionsmoleküle der Integrin-Familie essentielle Funktionen aus (Clegg et al., 2003). Moresco et al. (2005) und Marrs et al. (2006) konnten bereits zeigen, dass eine durch Integrine vermittelte Zelladhäsion für das Auswachsen und die Verzweigung von Dendriten sowie für die Aufrechterhaltung der Struktur des Dendritenbaumes von großer Bedeutung ist. Als Folge einer funktionellen Blockierung der Integrine konnten sie eine Reduktion bzw. eine Destabilisierung der dendritischen Fortsätze neuronaler Zellen beobachten.

In der Tat konnte ich in dieser Arbeit mit Hilfe des Disintegrin Echistatin nachweisen, dass eine Inaktivierung der Integrine auch die Ndr2-vermittelte Verzweigung der Dendriten hippocampaler Primärneurone blockierte. In meinen Versuchen wurden die Neurone 24 Stunden nach der Transfektion (DIV4) mit Echistatin behandelt. Vorversuche mit einem pEGFP-C1-Vektor hatten bereits zu diesem Zeitpunkt eine Expression von EGFP in hippocampalen Primärneuronen gezeigt. Da die Expression von EGFP und mCherry-Ndr2 über die Aktivität des CAG-Promotors reguliert wird, gehe ich davon aus, dass mCherry-Ndr2 in hippocampalen Primärneuronen ein ähnliches Expressionsprofil aufwies. Somit kann angenommen werden, dass die Wirkung des Disintegrins zeitgleich mit der Aktivität von Ndr2 in der Regulation des Auswachsens und der Verzweigung der Dendriten einsetzte. Neben einer Blockierung der stimulierenden Wirkung von Ndr2 auf die Verzweigung der Dendritenbäume induzierte Echistatin eine Reduktion der nahe am Soma liegenden kurzen (20 – 60 μm) dendritischen Fortsätze in Ndr2-überexprimierende Neuronen. Dies lässt vermuten, dass Ndr2 gleichermaßen abhängig von einer Integrin-vermittelten Zel-

ladhäsion nicht nur die Verzweigung des Dendritenbaumes, sondern auch das Auswachsen der dynamischen somanahen kurzen Fortsätze reguliert.

Doch über welche Mechanismen beeinflusst Ndr2 die Funktion der Integrine?

Für die Untersuchung einer Ndr2-vermittelten Regulation der Aktivität der Integrine verwendete ich stabil-transfizierte Zellen der neuronalen Zelllinie PC12. In diesen Zellen konnte ich für Ndr2 ebenfalls eine Abhängigkeit von einer Integrin-vermittelten Zelladhäsion beobachten. Interessanterweise blockierte eine Adhäsion der Zellen auf Kollagen IV die auf PDL beobachtete, durch Ndr2 induzierte Erhöhung des Neuritenlängenwachstums. PC12-Zellen binden über $\alpha1\beta1$ -Integrine an Kollagen IV, ein für die Zellen natürlicher Bestandteil der extrazellulären Matrix (Tomaselli et al., 1988; Hynes, 2002), wohingegen sich die Zellen aufgrund negativer Ladungen in ihrer Zellmembran nur durch elektrostatische Wechselwirkungen an das positiv geladene Polypeptid PDL anheften (Jacobson and Branton, 1977). Demzufolge deutet der beobachtete Effekt der Aktivität von Ndr2 auf Kollagen IV auf eine Abhängigkeit von der $\alpha1\beta1$ -Integrin-vermittelten Zelladhäsion hin. Jedoch hatte eine Blockierung der Ligandenbindung von $\alpha1\beta1$ -Integrinen durch das KTS-Disintegrin Obtustatin keinen Einfluss auf das Ndr2-vermittelte Neuritenwachstum. Eine Stimulierung der Integrin-Ligandenbindung wiederum zeigte nur einen unspezifischen Effekt, da sowohl Kontrollzellen als auch Zellen, die eine phosphorylierungsunabhängige Form von Ndr2 überexprimierten, eine Steigerung des Neuritenlängenwachstums aufwiesen. Somit hatte die extrazelluläre Beeinflussung der Aktivität der $\alpha1\beta1$ -Integrine, die auf eine *outside-in*-Signaltransmission hindeuten würde, keinen Effekt auf die Integrin-abhängige Aktivität von Ndr2.

Interessanterweise induzierte eine Überexpression von Ndr2 in stabil-transfizierten PC12-Zellen unabhängig von einer Kultivierung auf PDL oder Kollagen IV eine Akkumulation aktivierten $\beta1$ -Integrins in den Wachstumskegeln von Neuriten. Für diesen Nachweis verwendete ich einen Antikörper, welcher spezifisch die phosphorylierte Form von Threonin⁷⁸⁸ im zytosolischen Bereich von $\beta1$ -Integrin erkannte, da eine Phosphorylierung dieses Aminosäurerestes essentiell für die Aktivität von $\beta1$ -Integrin als Zelladhäsionsmolekül ist (Wennerberg et al., 1998). Nilsson et al. (2006) konnten anhand von Mutationsstudien zeigen, dass die Phosphorylierung von Threonin⁷⁸⁸ in einem *inside-out*-Signalweg durch eine noch unbekannt Kinase vermittelt wird und zu einer Aktivierung von $\beta1$ -Integrin führt. Als potentielle Aktivatoren werden in diesem Zusammenhang die Serin/Threonin Kinasen CamKII und PKC vermutet (Suzuki and Takahashi, 2003; Stawowy et al., 2005). Demzufolge weist die durch Ndr2 induzierte Erhöhung von Threonin⁷⁸⁸-phosphoryliertem $\beta1$ -Integrin in PC12-Zellen, die sowohl auf dem Integrin-unabhängigen Substrat PDL als auch auf dem Integrin-abhängigen Substrat Kollagen IV zu beobachten war, darauf hin, dass Ndr2 die Aktivierung von $\beta1$ -Integrin über eine Beteiligung in einem *inside-out*-Signalweg kontrolliert.

Es stellt sich allerdings die Frage, warum eine erhöhte Aktivität von $\beta1$ -Integrin das Ndr2-vermittelte Neuritenlängenwachstum auf Kollagen IV inhibiert. Nilsson et al. (2006) konnten durch eine Überexpression einer konstitutiv aktiven Form von $\beta1$ -Integrin eine Akkumulation des Rezeptors in fokalen Adhäsionskontakten beobachten, die zu einer Verringerung der Integrin-abhängigen Zellmigration führte. In meiner Arbeit konnte ich ebenfalls in stabil-transfizierten PC12-Zellen eine Ndr2-induzierte Akkumulation aktiven $\beta1$ -Integrins in den Wachstumskegeln von auswachsenden Neuriten beobachten. Da eine Blockierung der Zelladhäsion durch das Disintegrin Obtustatin keinen Einfluss auf das Ndr2-vermittelte Längenwachstum der Neuriten nahm, resultierte die Anhäufung von ak-

tiviertem $\beta 1$ -Integrin von Anfang an in einer verstärkten Adhäsion der Zellen auf Kollagen IV und damit in einer Inhibierung des Wachstums der Neuriten.

Doch warum inhibierte eine Überexpression von Ndr2 in hippokampalen Primärneuronen nicht das Auswachsen und die Verzweigung der Dendriten sondern förderte diese stattdessen?

Dies könnte auf die zelltypspezifische Expression von Integrinsubtypen zurückzuführen sein, da die für diese Untersuchungen verwendeten hippokampalen Primärkulturen mit einem Astrogliazellrasen kokultiviert worden sind. Hippokampale Primärkulturen sind keine reinen Neuronenkulturen (siehe Abb. 3.1), sondern stellen Mischkulturen aus überwiegend Neuronen, aber auch einem geringen Anteil an Gliazellen dar. Dabei ist die Anwesenheit von Astrogliazellen durchaus erwünscht, da diese die Ausbildung einer natürlichen extrazellulären Matrix vermitteln (John et al., 2006; Ruoslahti, 1996), so dass die Neurone in einer natürlichen Umgebung ausdifferenzieren können. Aufgrund der so generierten komplexen extrazellulären Matrix wird auch die Zell-Matrix-Adhäsion in den Neuronen über zahlreiche verschiedene Integrine vermittelt. Somit wurde die Funktion von Ndr2 in der neuronalen Differenzierung, im Gegensatz zu einer selektiven Abhängigkeit von $\alpha 1\beta 1$ -Integrinen in PC12-Zellen, in hippokampalen Primärneuronen abhängig von der Aktivität vieler verschiedener Integrine untersucht. In hippokampalen Neuronen werden unter anderem $\alpha 5\beta 1$ -, $\alpha v\beta 3$ - und $\alpha v\beta 1$ -Integrine exprimiert (Pinkstaff et al., 1998; Schuster et al., 2001; Pinkstaff et al., 1999; Cingolani et al., 2008). Echistatin bindet über seine RGD-Sequenz an die Ligandenstelle dieser Integrine und blockiert so deren Aktivität als Zelladhäsionsmoleküle (Williams, 1992). In der Tat konnte ich in der hier vorliegenden Arbeit nachweisen, dass eine Inhibition der Integrin-vermittelten Zelladhäsion in hippokampalen Primärneuronen zu einer Blockade der Ndr2-induzierten Erhöhung der Dendritenverzweigung führte. Meine gewonnenen Daten lassen daher vermuten, dass Ndr2 in Neuronen neben $\beta 1$ -Integrin auch die Aktivität anderer Integrine regulieren könnte und darüber das Auswachsen und die Verzweigung der Dendriten kontrolliert.

5.1.2 Ndr2 reguliert über Endozytose/Exozytose-Signalwege die Aktivität von Integrinen

Durch eine ständige Umverteilung von Integrinen in der Plasmamembran auswachsender Strukturen wird das Wachstum und die Differenzierung von Neuriten in Neuronen reguliert (Grabham et al., 2000; Eva et al., 2010). Vorhergehende Arbeiten von Stork et al. (2004) und Devroe et al. (2004) beschrieben bereits für die endogene und die transgene Ndr2-Kinase eine punktierte zytoplasmatische Verteilung in der Zelle. Diese Beobachtung konnte ich in meiner Arbeit in hippokampalen Primärneuronen für beide Expressionsformen von Ndr2 bestätigen. Diese Verteilung ähnelt der von Rab-GTPasen, die an Endosomen binden und in Endozytose/Exozytose-Signalwegen den Gehalt von Oberflächenrezeptoren in der Plasmamembran regulieren (Eva et al., 2010; Satoh et al., 2008; Zerial and McBride, 2001). Eva et al. (2010) konnten nachweisen, dass $\beta 1$ -Integrin in die Wachstumskegel auswachsender Axone über Rab11-positive Vesikel transportiert wird.

In der Tat konnte ich ebenfalls eine Kolokalisation von Ndr2 und $\beta 1$ -Integrin sowohl an frühen Endosomen als auch an Recycling-Endosomen nachweisen. Aufgrund meiner Daten über die zytosolische Verteilung von Ndr2 und die Ndr2-vermittelte Regulation der Verteilung aktivierten $\beta 1$ -Integrins in Wachstumskegeln stellte ich die Vermutung auf, dass die Kinase während der Differenzierung neuronaler Zellen die Verteilung der Integrine über ei-

ne Rekrutierung in auswachsende Strukturen reguliert. Um dies zu überprüfen untersuchte ich die Beteiligung von Ndr2 an Integrin-Endozytose/Exozytose-Signalwegen über potentielle Bindungspartner. Während Ndr2 keine direkte Interaktion mit den Rab-GTPasen Rab5 und Rab11 zeigte, konnte ich eine Bindung von Ndr2 an die GTPase Dynamin nachweisen. In Säugetieren werden drei verschiedene Isoformen von Dynamin exprimiert. Für Ndr2 konnte ich eine Bindung an die ausschließlich im Gehirn exprimierte Isoform Dynamin1 sowie an die im ganzen Organismus exprimierte Isoform Dynamin2 zeigen. Dynamin3 wird in erster Linie in den Hoden synthetisiert und kommt in nur sehr geringem Maße in der Lunge und im Gehirn vor (Hinshaw, 2000). Eine mögliche direkte Interaktion von Ndr2 mit Dynamin3 wurde von mir daher nicht untersucht.

Dynamin1 und Dynamin2 spielen im zentralen Nervensystem eine essentielle Rolle in der Vesikelbildung während der Rezeptor-vermittelten Endozytose, wie zum Beispiel bei der Internalisierung von Integrinen, aber auch während des Recyclings synaptischer Vesikel. Dabei lagern sich mehrere GTPasen an den Hals einer vesikulären Einstülpung an und induzieren somit die Abschnürung des Vesikels von der Plasmamembran (Roux et al., 2006; Caswell et al., 2009; Eva et al., 2010). Trotz der Übereinstimmung in ihren Funktionen sind beide Dynamin-Isoformen oft in unterschiedlichen strukturellen Subdomänen in der Plasmamembran anzutreffen (Altschuler et al., 1998). Des Weiteren wird ihre Bedeutung durch ihr Expressionslevel im Gehirn von Mäusen bestimmt. Dynamin1 ist die überwiegende Isoform im zentralen Nervensystem und in Neuronenkulturen erhöht sich ihr Proteingehalt parallel mit dem Beginn der Ausbildung von Synapsen. Zudem konnten Ferguson et al. (2007) beobachten, dass Dynamin1-defiziente Mäuse innerhalb der ersten zwei Wochen nach der Geburt sterben und in den Tieren die Endozytose synaptischer Vesikel massiv beeinträchtigt war. Somit scheint die Funktion von Dynamin1 essentiell für die synaptische Signaltransmission und das zugrunde liegende Recycling synaptischer Vesikel zu sein. Es stellt sich daher die Frage, ob Ndr2 über eine Interaktion mit Dynamin1 auch in der Synapse in Endozytoseprozessen involviert ist. Tatsächlich konnte ich in hippokampalen Primärneuronen beobachten, dass Ndr2 (Daten wurden in dieser Arbeit nicht gezeigt) mit den prä- bzw. postsynaptischen Proteinen Synaptophysin bzw. PSD-95 kolokalisierte. Somit ist eine Rolle von Ndr2 in der Endozytose synaptischer Vesikel nicht auszuschließen.

Doch weisen die in dieser Arbeit gewonnenen Daten darauf hin, dass Ndr2 während der Differenzierung neuronaler Zellen die Oberflächenexpression und dabei die Aktivität der Integrine reguliert. In diesem Zusammenhang vermute ich, dass Ndr2 zusammen mit Dynamin die Internalisierung der Integrine induziert (siehe Abb. 5.1), um über ein Recycling der Zelladhäsionsmoleküle deren Rekrutierung in auswachsende Strukturen zu kontrollieren. Funktionell involviert im Integrin-Endozytose/Exozytose-Signalweg koordiniert Ndr2 somit die Integrin-vermittelte Zelladhäsion um das Auswachsen und die Verzweigung der Dendriten von Neuronen zu regulieren.

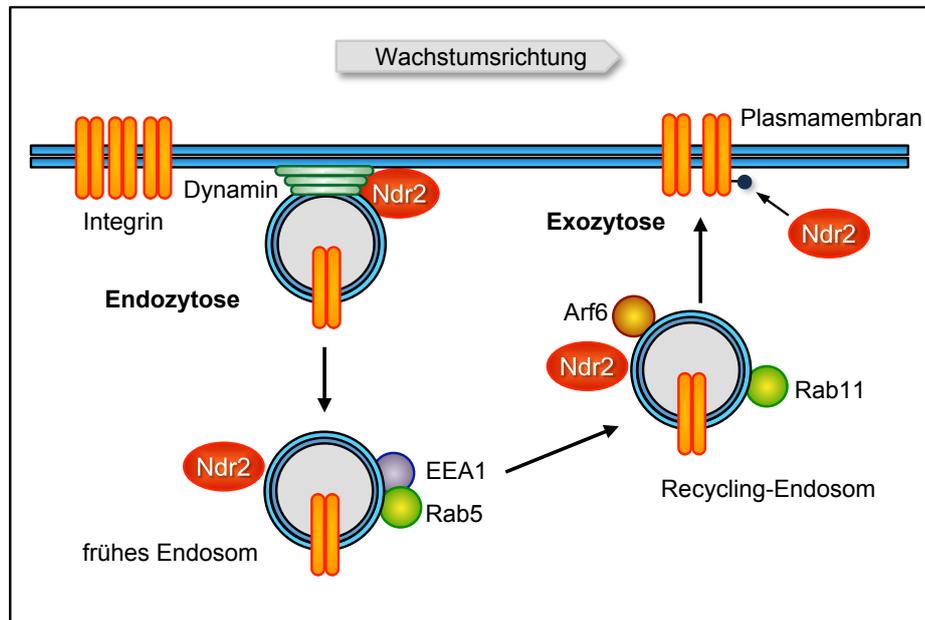


Abbildung 5.1: Modell der Interaktion von Ndr2 mit dem Endozytose/Exozytose-Signalweg der Integreine

Während des Auswachsens der Dendriten liegt Ndr2 an der Plasmamembran aktiviert vor und reguliert über eine Bindung an die GTPase Dynamin die Internalisierung der Integreine. Die internalisierten Zelladhäsionsmoleküle werden nun zunächst zu den frühen Endosomen transportiert, bevor sie über Rab11-positive Recycling-Endosomen wieder zurück an die Zelloberfläche gebracht werden, um sich dort erneut über eine Exozytose in die Plasmamembran zu integrieren, z. B. in einem Wachstumskegel. Während dieses Zyklus reguliert Ndr2 dabei möglicherweise direkt oder indirekt über bislang unbekannte Interaktionspartner die Aktivierung der Integreine und fördert so das Wachstum und die Verzweigung der Dendriten.

5.1.3 Ndr2 reguliert das Auswachsen und die Verzweigung der suprapiramidalen Moosfaserprojektionen im Hippokampus

Für die Untersuchung der Bedeutung der Serin/Threonin-Kinase Ndr2 *in vivo* wurde ein konditionales Ndr2-transgenes Mausmodell generiert. Dieses wurde gewählt, da die Expression von Ndr2 während der Konsolidierung eines Furchtgedächtnisses in der BLA furchtkonditionierter Mäuse erhöht wird und somit eine funktionelle Relevanz von Ndr2 in Lernprozessen vermuten lässt. Hinzu kommt, dass unsere Arbeitsgruppe in Ndr2-überexprimierenden PC12-Zellen bereits einen Einfluss der Kinase auf die neuronale Differenzierung der Zellen beobachten konnte (Stork et al., 2004). Aufgrund dessen stellen die zwei konditionalen transgene Mauslinien $Ndr2^{lox/tg55}$ und $Ndr2^{lox/tg89}$, in der über das Cre/loxP-Rekombinasesystem eine gewebe-, zelltyp- bzw. entwicklungs- und altersspezifische Induktion der Expression von transgenem Ndr2 ermöglicht wird (Utomo et al., 1999), jeweils ein hervorragendes Modell für eine Untersuchung der Funktion der Kinase *in vivo* dar. Für diese Arbeit wurden die Ndr2-transgenen Mäuse mit CamKII-CRE-transgenen Mäusen verpaart. Letztere exprimieren die Cre-Rekombinase unter dem CamKII α -Promotor. Somit wird die Expression von transgenem Ndr2 in doppelt-transgenen Nachkommen erst ab dem postnatalen Tag 15 und ausschließlich in exzitatorischen Neuronen des Vorderhirns induziert (Minichiello et al., 1999).

Bei der Generierung des Ndr2-trangenen Mausmodells wurden drei unabhängige Mauslinien erzeugt, jedoch konnte nur in CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg}-transgenen Mäusen der Linien Ndr2^{lox/tg55} und Ndr2^{lox/tg89}, nicht aber in der Linie Ndr2^{lox/tg68}, eine Expression von EGFP-Ndr2 im Gehirn nachgewiesen werden. In den Ndr2-trangenen Mäusen liegt die Expressionskassette durch eine Insertion an zufälliger Stelle im Genom der Maus eingebaut vor. In den Chromosomen gibt es Bereiche, in denen die DNA-Doppelhelix sehr stark kondensiert vorliegt. Die als Heterochromatin bezeichneten Regionen sind schwer oder gar nicht für RNA-Polymerasen zugänglich und somit werden Gene, die dort lokalisiert sind, kaum bzw. gar nicht transkribiert (Lodish, 2007). Es ist möglich, dass im Fall der Mauslinie Ndr2^{lox/tg68} die Insertion der Expressionskassette im Heterochromatin eines Chromosoms geschah und somit entweder die Cre-Rekombinase erst gar nicht das Gen der CAT katalytisch entfernen konnte oder eine Transkription des EGFP-Ndr2-Gens strukturell inhibiert wurde. Daher wurde die Charakterisierung nur mit CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg55}- und CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg89}-Mäusen fortgesetzt.

Eine Betrachtung der Expression von EGFP-Ndr2 in Hirnschnitten ließ erkennen, dass eine zelltypspezifische sowie spät postnatale Überexpression von Ndr2 keine schwerwiegenden morphologischen Veränderungen im Gehirn induzierte. In CamCre-Mäusen liegt das Enzym Cre-Rekombinase, welches unter dem CamKII α -Promotor ab einem Alter von P15 in den Tieren transkribiert wird, ab P20 stark exprimiert im Kortex, im Striatum, im Hippokampus sowie in der Amygdala vor (Minichiello et al., 1999). In adulten CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg55}- und CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg89}-Mäusen konnte ich ebenfalls eine Expression von EGFP-Ndr2 in diesen Vorderhirnregionen beobachten. Interessanterweise lag transgenes Ndr2 dabei verstärkt in den axonalen und dendritischen Fasern und weniger in den Somata der Neurone vor. Besonders im Hippokampus zeigte sich eine sehr hohe Expression des Fusionsproteins in den Axonen der Körnerzellen, welche als Moosfasern bezeichnet werden und sich in die suprapyramidalen und in die infra-intrapyramidalen Moosfaserprojektionen auftrennen (Faulkner et al., 2007). In der Maus sind die suprapyramidalen Moosfasern im Alter von P21 vollständig ausgereift, hingegen wachsen die infra-intrapyramidalen Moosfaseraxone während der Entwicklung zunächst sehr lang aus, bilden sich dann aber im Alter zwischen P20 und P30 sehr stark zurück – ein Prozess der als „*pruning*“ bezeichnet wird und im Alter von P45 abgeschlossen ist (Bagri et al., 2003; Amaral and Dent, 1981). In den für diese Arbeit verwendeten Ndr2-trangenen Mäusen lag EGFP-Ndr2 an P20 in den Körnerzellen des Hippokampus stark exprimiert vor. Folglich wäre eine Beteiligung von Ndr2, ähnlich wie bei der Differenzierung der Dendriten hippocampaler Primärneuronen, auch während des Wachstums der Axone der Körnerzellen möglich. In der Tat ergab eine Analyse der Terminaldichte der Moosfasern für CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg}-Mäuse eine Verringerung in der Dichte der suprapyramidalen Projektionen, während die Dichte der infra-intrapyramidalen Moosfaseraxone in den Tieren keine Veränderung aufwies. Aufgrund dieser Daten nehme ich an, dass Ndr2 eine wichtige Funktion, ähnlich derer wie sie bereits für die Differenzierung von Dendriten beschrieben wurde, in der Regulation des Auswachsens und der Verzweigung der Axone des suprapyramidalen Moosfaserbandes hat. Da transgenes Ndr2 ab dem postnatalen Tag P20 in den Körnerzellen des Hippokampus von CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg}-Mäuse stark exprimiert wird, kann ich in der vorliegenden Studie einen möglichen Einfluss von Ndr2 sowohl auf das Auswachsen als auch auf das *pruning* der infra-intrapyramidalen Moosfasern nicht ausschließen.

Ferner konnte im Gehirn von CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg}-transgenen Mäusen keine Beein-

flussung der Morphologie und der Dichte anderer axonaler Fasern, im Besonderen der Faserbündel des Corpus callosum und der Commissura anterior, beobachtet werden. Es stellt sich daher die Frage, ob eine früher in der Entwicklung induzierte Überexpression von Ndr2 die Ausbildung anderer axonaler Faserstrukturen ebenso beeinflussen würde oder ob Ndr2 spezifisch nur das Wachstum und die Verzweigung der Moosfasern im Hippokampus reguliert.

In Ratten, die eine hohe Risikobereitschaft gegenüber der Erkundung eines neuen Reizes aufwiesen, konnte eine verringerte Dichte der suprapyramidalen Moosfaserterminalien im Vergleich zu Ratten mit einer geringen Risikobereitschaft beobachtet werden (Isgor et al., 2004). In Übereinstimmung mit diesen Daten konnte mein Kollege Jorge R. Bergado-Acosta im Rahmen einer Verhaltensanalyse von CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg}-Mäusen ein erhöhtes Explorationsverhalten von CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg}-Mäusen in einem Offenfeld-Test beobachten (siehe Anhang Abb. 5.3). Somit könnte die verringerte Dichte der suprapyramidalen Moosfaserterminalien in Ndr2-transgenen Mäusen ebenfalls einen Einfluss auf die Risikobereitschaft der Tiere nehmen. Andere Studien konnten zudem mithilfe einer morphologischen und verhaltensbiologischen Analyse verschiedener Inzuchtstämme zeigen, dass die Dichte der infra-intrapiramidalen Moosfasern auch mit der Ausprägung des Explorationserhaltens von Mäusen in einem Offenfeld korreliert (Crusio and Schwegler, 1987). Weiterhin zeigten diese Analysen einen Zusammenhang zwischen der Terminaliendichte der infra-intrapiramidalen Moosfaserprojektionen und der Ausbildung eines Arbeitsgedächtnisses bzw. eines räumlichen Gedächtnisses. Ebenfalls konnte eine Korrelation der Dichte dieser Fasern mit der Ausprägung eines aktiven Vermeidungslernens sowie des männlichen Aggressionsverhaltens gegenüber gleichgeschlechtlichen Artgenossen beobachtet werden (Schwegler et al., 1988a; Schwegler and Lipp, 1983; Prior et al., 2004; Guillot et al., 1994; Schwegler and Crusio, 1995). Somit könnte eine Analyse des Verhaltens von CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg}-Mäuse in weiteren hippocampusabhängigen Lernparadigmen wie zum Beispiel in einem Shuttle-Box-Test oder einem Acht-Arm-Radial-Labyrinth-Test weiteren Aufschluss über einen Zusammenhang der in Ndr2-transgenen Tieren beobachteten morphologischen Veränderungen der Moosfaserterminalien mit Prozessen der Gedächtnisbildung geben.

Das konditionale Ndr2-transgene Mausmodell stellt somit vor dem Hintergrund der bisherigen Ergebnisse ein hervorragendes System zur weiteren Analyse Ndr2-abhängiger Funktionen im sich differenzierenden Nervensystem dar. Insbesondere frühere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe, die eine Induktion der Ndr2-Expression 6 Stunden nach einer klassischen Furchtkonditionierung zeigten, weisen darüber hinaus auch auf mögliche Funktionen im adulten Nervensystem hin. Um die Grundlagen für eine gezielte Untersuchung solcher lernbezogener Prozesse zu schaffen, untersuchte ich daher parallel zu den oben beschriebenen Entwicklungsprozessen die Bedeutung einer – potentiellen Ndr2-abhängigen – Aktinfilamentdynamik für die Gedächtnisbildung.

5.1.4 Die Konsolidierung und Rekonsolidierung eines Furchtgedächtnisses ist abhängig von der Dynamik des Aktinzytoskeletts in der BLA

Zahlreiche Befunde der letzten Jahre haben die besondere Bedeutung des Aktinzytoskeletts für die synaptische Plastizität und für die Informationsspeicherung im Nervensystem belegt (Lamprecht and LeDoux, 2004; Cingolani and Goda, 2008). Dabei konnte unter ande-

rem gezeigt werden, dass eine strukturelle Reorganisation der Aktinfilamente in der Amygdala essentiell für die Ausbildung eines Langzeitgedächtnisses ist (Mantzur et al., 2009). Jedoch blieb bislang ungeklärt, in welcher zeitlichen Phase der Gedächtniskonsolidierung eine Dynamik der Aktinfilamente in der Amygdala entscheidend für die Informationsspeicherung ist. Weiterhin war bisher unbekannt, ob eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts ebenfalls eine entscheidene Rolle in der Rekonsolidierung von Gedächtnisinhalten spielt.

Um diese Fragen zu beantworten, wurde in dieser Arbeit das Toxin Phalloidin, welches die Polymerisierung/Depolymerisierung von Aktinfilamenten blockiert, an drei verschiedenen Zeitpunkten in die BLA injiziert. Zwei Zeitpunkte stellten eine frühe (30 Minuten) sowie eine späte (6 Stunden) Phase der Gedächtniskonsolidierung bzw. -rekonsolidierung dar, während ein dritter (24 Stunden) als Kontrolle diente, da die Gedächtnisbildung in der Amygdala zu diesem Zeitpunkt bereits abgeschlossen war. Für die Analyse der Wirkung einer Phalloidin-Behandlung auf das Furchtverhalten von Mäusen wurde ein in unserem Labor etabliertes Paradigma verwendet, das eine Kombination aus einer Ton-/Hintergrundkontext-Furchtkonditionierung darstellte (Laxmi et al., 2003). Dieses Paradigma ermöglichte es, innerhalb einer Trainingseinheit bzw. innerhalb eines Gedächtnisabrufs den Einfluss der Aktindynamik auf die Konsolidierung bzw. Rekonsolidierung eines tonabhängigen sowie eines kontextabhängigen Furchtgedächtnisses gleichzeitig zu untersuchen und miteinander zu vergleichen. Dabei ist zu beachten, dass ein kontextuelles Furchtgedächtnis neben der Amygdala auch von der Aktivität des Hippokampus abhängig ist.

5.1.5 Eine Blockade der Aktindynamik in der BLA sechs Stunden nach der Akquisition beeinträchtigt die Konsolidierung eines tonabhängigen Furchtgedächtnisses

In der hier vorliegenden Arbeit konnte ich zeigen, dass eine Blockade der Aktindynamik in der BLA durch eine Behandlung mit Phalloidin nur zum Zeitpunkt sechs Stunden nach dem Training selektiv zu einer Beeinträchtigung des tonkonditionierten, nicht aber eines generalisierten sowie kontextkonditionierten Furchtgedächtnisses führte. Eine Inaktivierung oder Läsion der Amygdala kann sich ebenfalls in dem Verlust einer Furchtantwort ausdrücken (Maren and Quirk, 2004), doch konnte ich für meine Untersuchung eine andauernde Störung der Amygdala durch Phalloidin ausschließen, da eine Behandlung mit dem Toxin zum Zeitpunkt 24 Stunden die Konsolidierung des tonabhängigen Furchtgedächtnisses nicht beeinflusste. Ebenso konnte mithilfe eines Erhöhten-Plus-Labyrinth-Tests nachgewiesen werden, dass eine Injektion von Phalloidin in die BLA keine generelle Veränderung des Angstverhaltens der Tiere verursachte. Eine Behandlung mit Phalloidin sechs Stunden nach dem Training führte nur zu einer verringerten Ausprägung der Furchtantwort auf den CS^+ , nicht aber auf den CS^- sowie den Kontext. Diese Beobachtungen weisen folglich darauf hin, dass in der BLA in einer bestimmten zeitlichen Phase eine Inhibierung der strukturellen Reorganisation des Aktinzytoskeletts die Konsolidierung eines tonabhängigen Furchtgedächtnisses stark beeinträchtigt, jedoch nicht die Funktion der BLA in der Informationsspeicherung der kontextuellen (Gale et al., 2004) und nicht-assoziativen (Sigmund and Wotjak, 2006) Komponenten des Furchtgedächtnisses beeinflusst. Lediglich eine Verringerung in der Ausprägung der Furchtantwort auf den CS^- , induziert durch eine Applikation von Phalloidin 30 Minuten nach dem Training, konnte beobachtet werden. Hingegen wurde das ton- bzw. kontextkonditionierte Furchtgedächtnis durch eine Blockade der Aktinfilamentdynamik zu diesem Zeitpunkt nicht beeinträchtigt.

Dies spricht gegen eine Generalisierung der Furchtantwort auf einen neutralen Tonreiz. eine Störung der Speicherung der nicht-assoziativen Informationen in der BLA könnte diese selektive Störung der Furchtantwort auf den CS⁻ jedoch erklären.

Im Gegensatz zu einer sofort im Anschluss an eine Fruchtkonditionierung erfolgten Applikation des die Aktinfilamente destabilisierenden Toxins Cytochalasin D (Mantzur et al., 2009), hatte in dieser Studie, wie bereits erwähnt, eine Behandlung mit Phalloidin dreißig Minuten nach dem Training, keinen Effekt auf die Konsolidierung eines tonabhängigen Furchtgedächtnisses. Hinweise für eine Erklärung für diesen Effekt gibt die Studie von Fukazawa et al. (2003), in der bereits 20 Minuten nach einer hochfrequenten Stimulation des Tractus perforans eine Erhöhung des F-Aktinlevels in dendritischen Spines der Körnerzellen im Hippokampus nachgewiesen werden konnte. Interessanterweise wurde zusätzlich gezeigt, dass eine Blockade der Aktinpolymerisation nur eine Inhibition der späten Phase einer LTP im Gyrus dentatus zur Folge hatte, wenn eine Behandlung mit Latrunculin A 8 Stunden, jedoch nicht direkt 30 Minuten nach der Stimulation erfolgte. Dabei wird die LTP durch eine Verstärkung der synaptischen Signalübertragung induziert. Diese wiederum wird unter anderem durch Aktin-abhängige Prozesse reguliert, zum Beispiel induziert eine Stimulation der Aktinpolymerisation die Aktivierung inaktiver Synapsen (Yao et al., 2006). Weiterhin wird über eine Reorganisation der Aktinfilamente die strukturelle Neu- bzw. Umbildung von dendritischen Spines vermittelt (Matus, 2000). Somit bilden diese Prozesse eine der zellulären Grundlagen der Gedächtnisbildung im adulten Gehirn (Lamprecht and LeDoux, 2004). Freir et al. (2010) konnten bereits darauf hinweisen, dass innerhalb des Zeitraums von 6 bis 12 Stunden nach einer Konditionierung strukturelle Veränderungen von Synapsen an der Gedächtniskonsolidierung beteiligt sind. Anhand der Übereinstimmungen meiner Beobachtungen mit den von Fukazawa et al. (2003) und Freir et al. (2010) beschriebenen Daten kann ich somit bestätigen, dass eine strukturelle Reorganisation des Aktinzytoskeletts in der BLA in der späten Phase 6 bis 12 Stunden nach einer tonassozierten Furchtkonditionierung essentiell für die Gedächtniskonsolidierung ist. Dabei vermute ich, dass in diesem Zeitraum Prozesse aktiviert werden, die über eine Dynamik der Aktinfilamente die Neubildung bzw. den strukturellen Umbau von Spines sowie die Aktivierung von Synapsen regulieren und somit die Grundlage für die Gedächtnisspeicherung bilden.

5.1.6 Die Rekonsolidierung eines tonabhängigen Furchtgedächtnisses unterliegt ebenfalls einer strukturellen Reorganisation der Aktinfilamente in der BLA

Es ist seit längerem bekannt, dass die Rekonsolidierung eines Furchtgedächtnisses mit einer selektiven Reaktivierung kürzlich modifizierter Signalkreise in der Amygdala einhergeht (Doyère et al., 2007). Des Weiteren unterliegt sie – ebenso wie die initiale Konsolidierung – einer amygdalären Plastizität (Nader and Hardt, 2009). In der hier vorliegenden Arbeit konnte ich wie schon zuvor für die Konsolidierung zeigen, dass spezifisch nur das tonabhängige Furchtgedächtnis beeinträchtigt wurde, wenn sechs Stunden nach dessen Reaktivierung eine Blockade der Aktindynamik in der BLA durch Phalloidin induziert wurde. Eine Behandlung mit dem Toxin zum Zeitpunkt 24 Stunden nach dem Furchtgedächtnisabruf hatte indessen keinen Effekt auf die Rekonsolidierung, so dass an diesem Zeitpunkt die von einer Aktindynamik abhängige sensitive Phase während der Gedächtnisspeicherung bereits vorüber war. Gewiss kann die verringerte Furchtantwort der

Tiere, die eine Injektion mit Phalloidin zum Zeitpunkt 6 Stunden erhalten hatten, statt auf einer Störung der Rekonsolidierung des Furchtgedächtnisses auch auf eine erhöhte Extinktion hindeuten. Dies ist jedoch sehr unwahrscheinlich, da aufgrund einer Blockierung der Aktinfilamentdynamik während der Extinktion eine die Gedächtnisausprägung fördernde Wirkung zu erwarten gewesen wäre (Fischer et al., 2004), in dieser Studie aber nur ein gegensätzlicher verringernder Effekt beobachtet worden ist.

Ferner konnte eine Beeinträchtigung der Rekonsolidierung in der Ausprägung des tonabhängigen, aber auch des kontextuellen und generalisierten Furchtgedächtnisses durch eine Behandlung mit Phalloidin 30 Minuten nach dessen Reaktivierung beobachtet werden. Diese generalisierte Furchtantwort der mit Phalloidin behandelten Tiere weist darauf hin, dass in einer frühen Phase der Rekonsolidierung, in der bereits eine Destabilisierung der Gedächtniskomponenten induziert wurde, eine Blockade der Aktinfilamentdynamik in der BLA die erneute Speicherung der assoziativen, nicht-assoziativen und kontextuellen Informationen des Furchtgedächtnisses möglicherweise inhibierte.

5.1.7 Phalloidin erhöht den Gehalt komplexer Aktinfilamente zwei Stunden nach der Injektion

Für die Untersuchung des Einflusses einer Inhibition der Aktinfilamentdynamik auf die Konsolidierung bzw. Rekonsolidierung eines Furchtgedächtnisses wurde Phalloidin zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Akquisition bzw. Reaktivierung des Gedächtnisses in die BLA injiziert. Dabei konnte ich beobachten, dass Tiere, die zum Zeitpunkt 6 Stunden nach dem Training bzw. dem Abruf des Furchtgedächtnisses mit Phalloidin behandelt wurden, eine verringerte Furchtantwort auf den konditionierten Stimulus zeigten.

Doch zu welchem Zeitpunkt blockierte Phalloidin die Polymerisation/Depolymerisation der Aktinfilamente in den Neuronen der BLA?

Eine Betrachtung auf zellulärer Ebene zeigte, dass Phalloidin bereits 10 Minuten nach einer Injektion in den Zellen an einigen Aktinfilamenten gebunden vorlag. Eine genauere Betrachtung auf Proteinebene offenbarte, dass zwei Stunden nach der Injektion Phalloidin den Gehalt des hoch verzweigten F-Aktins in den Zellen stark erhöhte. Indessen konnte für die Zeitpunkte 10 Minuten, 30 Minuten oder 6 Stunden keine Veränderung in den unterschiedlichen Aktinfraktionen gegenüber der Vehikelkontrolle beobachtet werden. Phalloidin erreichte folglich in den Neuronen innerhalb von zwei Stunden seine vollständige, die Polymerisation/Depolymerisation der Aktinfilamente blockierende Wirkung, welche innerhalb von 4 weiteren Stunden wieder nachließ und schließlich nicht mehr nachzuweisen war. Somit verursachte eine Blockade der Reorganisation der Aktinfilamente in der BLA in dem Zeitraum von 6 bis 12 Stunden nach der Akquisition bzw. Reaktivierung eine Störung der Konsolidierung bzw. Rekonsolidierung eines tonabhängigen Furchtgedächtnisses (siehe Abb. 5.2).

Interessanterweise konnte unsere Arbeitsgruppe innerhalb dieser von der Aktindynamik abhängigen, kritischen Phase während der Konsolidierung eines tonabhängigen Furchtgedächtnisses eine erhöhte Expression von β -Aktin, aber auch von der Serin/Threonin-Kinase Ndr2 in der BLA nachweisen (Stork et al., 2004; Stork et al., 2001). Ndr2 wiederum bindet an β -Aktin und könnte demzufolge in der BLA während der Gedächtnisbildung eine Rolle bei der Reorganisation der Aktinfilamente spielen. In der Amygdala ist die Konsolidierung eines Furchtgedächtnisses sowohl abhängig von der Transkription als auch der Translation bestimmter Proteine, wohingegen die Rekonsolidierung nur von der Trans-

lation abhängig ist (Parsons et al., 2006). Folglich könnte die Ndr2-Kinase während der Rekonsolidierung über eine Translation ihrer innerhalb der initialen Konsolidierung gebildeten mRNA neben der Gedächtnisbildung ebenso eine wichtige Funktion in der erneuten Speicherung der Inhalte eines Furchtgedächtnisses besitzen. In dieser Arbeit konnte ich während der Differenzierung von Neuronen zeigen, dass Ndr2 über eine Regulation von Integrinen das Auswachsen und die Verzweigung von Dendriten kontrolliert. Im adulten Gehirn wird die strukturelle Neu- bzw. Umbildung von Spines über eine Reorganisation der Aktinfilamente induziert. Diese wiederum ist abhängig von Integrinen in den Spinesynapsen (Lynch et al., 2007; McGeachie et al., 2011). Es ist seit langem bekannt, dass die Plastizität der Spines den Prozessen der Gedächtnisbildung zugrunde liegt. Somit könnte die auch in Synapsen vorliegende Ndr2-Kinase über eine Regulation der Aktivität der Integrine in der BLA in der Furchtgedächtnisbildung involviert sein.

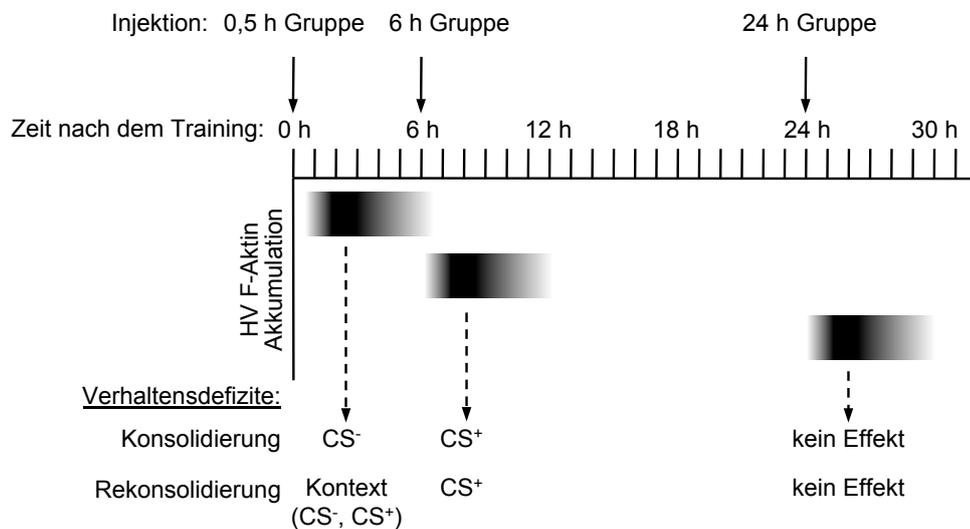


Abbildung 5.2: Modell des zeitlichen Verlaufs der Wirkung von Phalloidin in der BLA auf die Konsolidierung bzw. Rekonsolidierung des tonabhängigen, kontextuellen bzw. generalisierten Furchtgedächtnisses

Phalloidin lag bereits 10 Minuten nach der Injektion gebunden an Aktinfilamenten in den Neuronen vor. Eine die Aktinfilamentdynamik blockierende massive Wirkung des Toxins konnte indes durch eine Erhöhung des Anteils hoch verzweigter Aktinfilamente (HV F-Aktin) in den Neuronen der BLA 2 Stunden nach einer Behandlung mit Phalloidin bestätigt werden. Somit beeinträchtigt eine Blockade der Aktinfilamentdynamik in einer kritischen Phase zwischen 6 und 12 Stunden nach dem Training bzw. dem 1. Abruf des Furchtgedächtnisses die Konsolidierung bzw. Rekonsolidierung der Informationen über den konditionierten Stimulus CS⁺, nicht aber über den Kontext bzw. den CS⁻.

Ferner konnte für die mit Ndr2 verwandte Ndr-Kinase LATS1 gezeigt werden, dass diese an die Kinase LIMK1 bindet und dabei deren Aktivität inhibiert. Dies hat zur Folge, dass Cofilin, ein Aktin-depolymerisierendes Protein, nicht mehr durch LIMK1 phosphoryliert und damit inaktiviert wird, so dass der Abbau von Aktinfilamenten verstärkt wird (Yang et al., 2004). Während der von einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts abhängigen, kritischen Phase der Konsolidierung eines Furchtgedächtnisses wird Ndr2 in der BLA verstärkt exprimiert. Aufgrund der hohen Konservierung der Ndr-Kinasen in ihren Funktionen stellt Ndr2 ebenfalls einen potentiellen negativen Regulator von LIMK1 dar und könnte somit während der Gedächtnisbildung über eine Stimulation der Aktindepolymerisation ent-

scheidend an der Regulation der Dynamik der Aktinfilamente beteiligt sein.

Mit einer Verhaltensanalyse von CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg}-Mäusen überprüfte mein Kollege Jorge R. Bergado-Acosta eine mögliche derartige Beteiligung von Ndr2 in Prozessen der Furchtgedächtnisbildung. Nach einer auditorischen Furchtkonditionierung konnte er jedoch keine Veränderungen in der Ausprägung eines Furchtgedächtnisses der Tiere beobachten (siehe Anhang Abb. 5.4). Die Überexpression von Ndr2 *in vivo* beeinflusste dabei weder die Gedächtniskonsolidierung noch deren Rekonsolidierung. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass in der Amygdala von CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg}-Mäusen, neben einer starken Expression transgener Ndr2-Kinase im zentralen Unterkern, nur eine sehr schwache in der lateralen und basolateralen Amygdala nachzuweisen war (siehe Kapitel Ergebnisse Abb. 4.20). Dies könnte erklären warum CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg}-Mäuse keine Veränderung in der Gedächtnisausprägung nach einer Furchtkonditionierung zeigten. Eine über Viruspartikel induzierte lokale Expression transgener Ndr2-Kinase in der BLA könnte daher Aufschluss darüber geben, ob eine Überexpression von Ndr2 möglicherweise doch Einfluss auf die Prozesse der Gedächtnisbildung nimmt.

5.1.8 Schlussfolgerungen und zukünftige Perspektiven

Mit der hier vorliegenden Arbeit konnte ich für die in Säugetieren vorkommende Ndr-Kinase Ndr2 eine Schlüsselfunktion in der Differenzierung von Neuronen während der Entwicklung des zentralen Nervensystems nachweisen. An hippokampalen Primärkulturen konnte ich dabei zeigen, dass Ndr2 insbesondere abhängig von einer Integrin-vermittelten Zelladhäsion das Auswachsen und die Verzweigung der Dendriten kontrolliert. Während dieser morphologischen Prozesse reguliert Ndr2 zudem über eine funktionelle Beteiligung in einem *inside-out*-Signalweg in auswachsenden Strukturen wie Wachstumskegeln die Aktivität der Integrine. Des Weiteren bindet Ndr2 an die GTPase Dynamin und kolokalisiert in den Neuronen mit den Endosomen des Endozytose/Exozytose-Signalweges der Integrine. Aufgrund dieser Ergebnisse vermute ich, dass Ndr2 über zwei funktionelle Wege die Aktivität der Integrine während des Auswachsens und der Verzweigung von Dendriten reguliert. Über eine Interaktion mit Dynamin induziert Ndr2 zum einen die Endozytose der Integrine und vermittelt dadurch eine Rekrutierung der Zelladhäsionsmoleküle in die Wachstumskegel der Dendriten. Zum anderen stimuliert Ndr2 während des Recyclings der Zelladhäsionsmoleküle über eine Beteiligung in einem *inside-out*-Signalweg die Aktivierung der Integrine. Somit kontrolliert Ndr2 in Neuronen über eine Regulation der Verteilung aktivierter Integrine in der Plasmamembran die lokale Integrin-vermittelte Zelladhäsion und damit das Auswachsen und die Verzweigung der Dendriten.

Ausgehend von der Annahme einer funktionellen Beteiligung von Ndr2 in dem Endozytose/Exozytose-Signalwege der Integrine bedarf es weiterer Untersuchungen in der Zukunft. Dabei wäre ein erster Schritt über eine Stimulation von Endozytose- bzw. Exozytose-Prozessen eine mögliche Einflussnahme von Ndr2 auf die Oberflächenexpression der Integrine zu überprüfen. Ein weiterer Schritt für die genaue funktionelle Positionierung von Ndr2 im Endozytose/Exozytose-Signalweg der Integrine stellt die Untersuchung einer möglichen direkten Phosphorylierung von Dynamin durch Ndr2 dar. Ferner könnte die Analyse einer potentiellen Phosphorylierung der Integrinuntereinheiten $\beta 1$ und $\beta 3$ durch Ndr2 Aufschluss darüber geben, ob die Kinase über eine direkte *inside-out*-Aktivierung die Aktivität der Zelladhäsionsmoleküle während der Differenzierung von Neuronen reguliert. Systematisch sollten dann Ndr2-aktivierende Signalwege untersucht werden, welche

die Aktivität von Ndr2 in verschiedenen neuronalen Zelltypen steuern.

Anhand eines konditionalen Ndr2-transgenen Mausmodells konnte zudem eine Rolle von Ndr2 in der Regulation des Auswachsens und der Verzweigung von Axonen nachgewiesen werden. Es ist anzunehmen, dass Ndr2 auch das axonale Wachstum über eine Regulation der Integrin-vermittelten Zelladhäsion kontrolliert. Synthetische RGD-Peptide sowie das Schlangentoxin Echistatin besitzen die gleiche Ligandenbindungssequenz für verschiedene Integrine und blockieren somit die Aktivität der Integrine als Zelladhäsionsmolekül. Daher könnte eine intraventrikuläre Applikation eines RGD-Peptids in Ndr2-transgenen Mäusen und eine sich daran anschließende Analyse der Dichte der Moosfaserterminalien im Hippokampus Aufschluss darüber geben, ob Ndr2 das Auswachsen der suprapyramidalen Fasern ebenfalls abhängig von einer Integrin-vermittelten Zelladhäsion reguliert. Darüber hinaus bietet die Behandlung mit einem RGD-Peptid *in vivo* die Möglichkeit, die in dieser Arbeit dargelegte Integrin-abhängige Funktion von Ndr2 in der neuronalen Differenzierung von hippokampalen Primärkulturen nun auf die Entwicklung des zentralen Nervensystems zu übertragen. Zum Beispiel könnte hierfür die Analyse einer immunhistochemischen Färbung des Dendritenmarkerproteins Map2 in den verschiedenen Schichten des Hippokampus (Stratum oriens, Stratum radiatum, Stratum lacunosum-moleculare und Stratum moleculare) von RGD-Peptid-behandelten Ndr2-transgenen Mäusen Aufschluss über die regulatorische Funktion von Ndr2 in der Verzweigung der Dendriten *in vivo* geben.

Ferner könnte ebenfalls anhand Ndr2-transgener Mäuse untersucht werden, ob Ndr2, ähnlich wie ihre Homologen Tricornered und SAX-1, über eine Regulation der Prozesse *tiling* und *self-avoidance* die Verzweigung der Dendriten sensorischer Neurone kontrolliert. Hierbei könnte die Analyse der Dendritenbäume von Ganglienzellen in der Retina der Tiere Aufschluss über eine mögliche Funktion von Ndr2 in der Ausbildung ihrer rezeptiven Felder geben. Mithilfe des konditionalen Ndr2-transgenen Mausmodells könnte auch eine mögliche Rolle von Ndr2 in neuronalen Regenerationsprozessen untersucht werden. In der Literatur wird seit langem diskutiert, ob ähnlich wie in peripheren Nerven eine Regeneration der Axone sensorischer Neurone des ZNS *in vivo* ebenfalls über die Aktivität von Integrinen reguliert wird (Lemons and Condic, 2008). Eva et al. (2010) vermuten zum Beispiel, dass aufgrund einer Störung des Transports bzw. der Aktivierung der Integrine in verletzten Axonen des Rückenmarks Regenerationsprozesse *in vivo* inhibiert werden. In der hier vorgelegten Arbeit konnte ich zeigen, dass Ndr2 die Aktivität der Integrine in auswachsenden Strukturen reguliert. Weiterhin legen meine Daten eine mögliche Funktion von Ndr2 in Endozytose/Exozytose-Signalwege der Integrine nahe. Daher vermute ich, dass eine Überexpression von Ndr2 in transgenen Mäusen die Aktivierung und den Transport von Integrinen in beschädigten Axonen, z. B. des Rückenmarks, stimulieren und dadurch möglicherweise die Regeneration von Nerven des ZNS fördern könnte.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit konnte ich die Relevanz einer strukturellen Reorganisation des Aktinzytoskeletts während einer kritischen Phase in der Konsolidierung bzw. Rekonsolidierung für ein tonabhängiges Furchtgedächtnisses nachweisen. Dabei führte eine Blockade der Aktindynamik in der BLA durch eine Behandlung mit Phalloidin im Zeitraum zwischen 6 und 12 Stunden nach der Akquisition bzw. der Reaktivierung zu einer Beeinträchtigung eines tonkonditionierten Furchtgedächtnisses. Interessanterweise konnte unsere Arbeitsgruppe in früheren Studien zeigen, dass innerhalb dieses Zeitraums nach einer tonassoziierten Furchtkonditionierung sowohl β -Aktin als auch Ndr2 in der BLA vermehrt exprimiert wird. Daher stellt eine zukünftige quantitative Erfassung des Proteingehaltes der Kinase in der BLA während der von einer Aktindynamik abhängigen kritischen Phase

der Gedächtniskonsolidierung bzw. -rekonsolidierung zunächst einen wichtigen Schritt zur Bestimmung der funktionellen Bedeutung von Ndr2 während dieser Prozesse dar. Darauf aufbauend könnte in einem nächsten Schritt untersucht werden, ob ein funktioneller Verlust von Ndr2 in der BLA, ähnlich wie die Blockade der Dynamik von Aktinfilamenten, die Konsolidierung bzw. Rekonsolidierung eines tonabhängigen Furchtgedächtnisses beeinträchtigen würde. So wäre es möglich, mittels einer shRNA-vermittelten Inhibierung der Expression von Ndr2 in der BLA durch eine Injektion kürzlich in unserer Arbeitsgruppe erzeugter lentiviraler Vektoren, lokal eine massive Reduktion des Gehaltes der Ndr2-mRNA zu induzieren. Weiterhin könnte mithilfe der konditionalen Ndr2-transgenen Mauslinie ein möglicher Einfluss einer lokalen Überexpression von Ndr2 in der BLA auf die Ausbildung eines Furchtgedächtnisses untersucht werden. Dabei wäre zu klären, ob Ndr2 an der Regulation der Aktinfilamentdynamik während der Gedächtniskonsolidierung bzw. -rekonsolidierung beteiligt ist. Diese Untersuchung würde ebenfalls über eine lokale Applikation von lentiviralen Partikeln in die BLA ermöglicht werden, die durch Expression einer Cre-Rekombinase eine Aktivierung des Transgens und damit eine lokale Überexpression von Ndr2 beschränkt auf dieses Kerngebiet hervorrufen würde.

Anhang

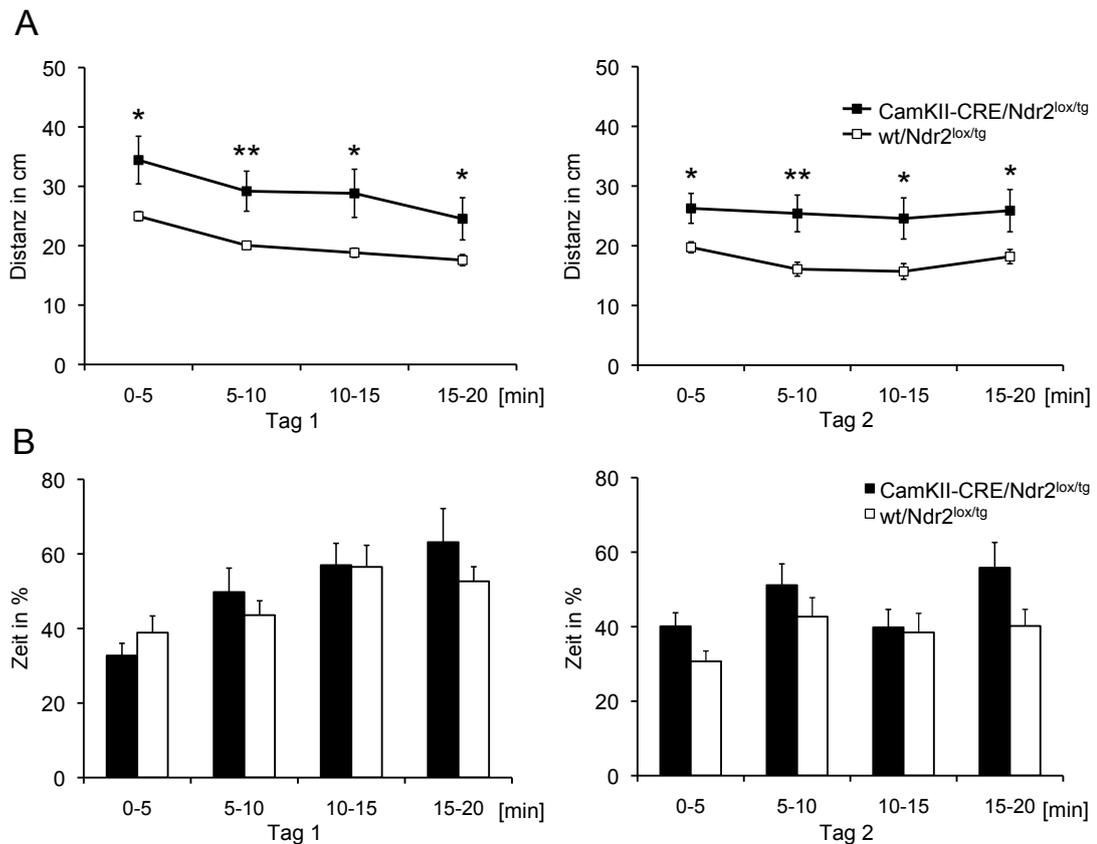


Abbildung 5.3: Erhöhtes Explorationsverhalten von CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg}-Mäuse in einem Offenfeldtest

Vor dem Beginn der Verhaltensanalyse wurden adulte (9-12 Wochen) männliche CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg}-Mäuse ($n = 9$) und wt/Ndr2^{lox/tg}-Mäuse ($n = 12$) eine Woche lang einzeln gehalten. Anschließend wurde in einem Offenfeld (50 cm x 50 cm x 50 cm) und unter geringen Lichtverhältnissen (10 Lux) an zwei Tagen für jeweils 20 min mithilfe der Software ANY-Maze Videotracking System V 4.50 die Bewegungen der Tiere aufgenommen und das Explorationsverhalten analysiert. **A** CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg}-Mäuse zeigten gegenüber und wt/Ndr2^{lox/tg}-Mäusen über den ganzen Zeitverlauf hinweg in beiden Testdurchgängen ein kontinuierlich erhöhte Aktivität (RANOVA, $F_{1,38} = 16,320$; $p = 0,000$). **B** Eine verringerte Ängstlichkeit von CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg}-Mäusen konnte dabei gegenüber wt/Ndr2^{lox/tg}-Mäusen anhand der Aufenthaltsdauer in der Mitte des Offenfelds in beiden Testdurchgängen ausgeschlossen werden (RANOVA, $F_{1,38} = 2,063$; $p = 0,159$). Werte sind dargestellt als MW \pm SFM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ im Vergleich zu wt/Ndr2^{lox/tg}-Mäusen

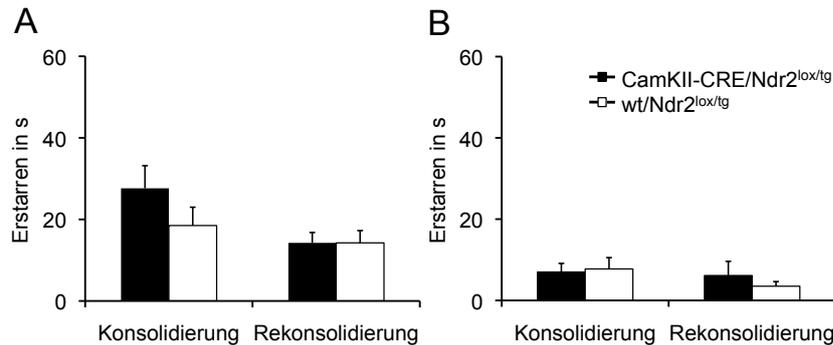


Abbildung 5.4: CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg}-Mäuse zeigen keine Veränderung in der Konsolidierung bzw. Rekonsolidierung eines tonassozierten Furchtgedächtnisses

Eine Woche vor Beginn der auditorischen Furchtkonditionierung wurden adulte (9-12 Wochen) männliche CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg}-Mäuse ($n = 8$) und wt/Ndr2^{lox/tg}-Mäuse ($n = 8$) einzeln gehalten. In einer Furchtkonditionierungsapparatur (siehe Kapitel Methoden Abs. 3.2.3) konnten die Tiere sich zunächst in zwei Adaptationsphasen, die an zwei aufeinanderfolgenden Tagen stattfanden, an den Trainingskontext (Plexiglaskammer mit Metallgitter, sensorische Reize) habituieren. Während der Adaptation wurde den Mäusen mit einem Abstand von 20 s sechsmal aufeinanderfolgend der CS⁻, ein 2,5 kHz hoher und 85 dB lauter Ton, für jeweils 10 s vorgespielt. Am darauffolgenden Tag fand die Furchtkonditionierung der Mäuse statt. Dabei wurde den Tieren dreimal hintereinander der CS⁺ in Form eines Tones (10 kHz, 85 dB, 9 s) zusammen mit einem US (elektrischer Fußschock, 0,4 mA, 1 s) gepaart präsentiert. Vierundzwanzig Stunden später wurde die Ausprägung des Furchtgedächtnisses durch eine erneute dreimalige Präsentation des CS⁺ abgerufen. Mithilfe von Lichtschranken wurde dabei das Bewegungsverhalten der Tiere aufgezeichnet und über die TSE Fear Conditioning Software das Erstarrungsverhalten analysiert. Um für den Abruf des Furchtgedächtnisses einen neutralen Kontext zu erzeugen, wurde ein Standardkäfig mit Einstreu in der Furchtkonditionierungsbox positioniert. Eine Woche später wurde das Furchtgedächtnis erneut durch dreimaliges präsentieren des CS⁺ in dem neutralen Kontext getestet.

A CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg}-Mäuse zeigten gegenüber wt/Ndr2^{lox/tg}-Mäusen keine signifikante Veränderung in der Ausprägung eines tonassozierten Furchtgedächtnisses (RANOVA, $F_{1,14} = 1,011$; $p = 0,332$ n.s.). Dabei zeigten die Tiere keinen Unterschied sowohl in der Konsolidierung als auch in der Rekonsolidierung des Furchtgedächtnisses.

B Wie zu erwarten konnte sowohl für CamKII-CRE/Ndr2^{lox/tg}-Mäuse als auch für wt/Ndr2^{lox/tg}-Mäusen keine Ausprägung eines Furchtgedächtnisses für den CS⁻ beobachtet werden (Konsolidierung: $F_{1,14} = 0,892$; $p = 0,361$ n.s., Rekonsolidierung: $F_{1,14} = 0,217$; $p = 0,648$ n.s.). Werte sind dargestellt als MW \pm SFM.

Literaturverzeichnis

- Abram CL, Lowell CA (2009) The ins and outs of leukocyte integrin signaling. *Annual review of immunology* 27:339–362.
- Alberini CM (2005) Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends in neurosciences* 28:51–56.
- Alexopoulou AN, Couchman JR, Whiteford JR (2008) The CMV early enhancer/chicken beta actin (CAG) promoter can be used to drive transgene expression during the differentiation of murine embryonic stem cells into vascular progenitors. *BMC cell biology* 9:2.
- Altschuler Y, Barbas SM, Terlecky LJ, Tang K, Hardy S, Mostov KE, Schmid SL (1998) Redundant and distinct functions for dynamin-1 and dynamin-2 isoforms. *The Journal of cell biology* 143:1871–1881.
- Amaral DG, Dent JA (1981) Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. *The Journal of comparative neurology* 195:51–86.
- Andrews MR, Czvitkovich S, Dassie E, Vogelaar CF, Faissner A, Blits B, Gage FH, French Constant C, Fawcett JW (2009) Alpha9 integrin promotes neurite outgrowth on tenascin-C and enhances sensory axon regeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:5546–5557.
- Bagri A, Cheng HJ, Yaron A, Pleasure SJ, Tessier-Lavigne M (2003) Stereotyped pruning of long hippocampal axon branches triggered by retraction inducers of the semaphorin family. *Cell* 113:285–299.
- Banker G, Goslin K (1998) *Culturing Nerve Cells* Massachusetts Institute of Technology, second edition edition.
- Bernard-Trifilo JA, Kramár EA, Torp R, Lin CY, Pineda EA, Lynch G, Gall CM (2005) Integrin signaling cascades are operational in adult hippocampal synapses and modulate NMDA receptor physiology. *Journal of neurochemistry* 93:834–849.
- Bhattacharya S, Large E, Heizmann CW, Hemmings B, Chazin WJ (2003) Structure of the Ca²⁺/S100B/NDR kinase peptide complex: insights into S100 target specificity and activation of the kinase. *Biochemistry* 42:14416–14426.
- Bichsel SJ, Tamaskovic R, Stegert MR, Hemmings BA (2004) Mechanism of activation of NDR (nuclear Dbf2-related) protein kinase by the hMOB1 protein. *The Journal of biological chemistry* 279:35228–35235.

- Bidlingmaier S, Weiss EL, Seidel C, Drubin DG, Snyder M (2001) The Cbk1p pathway is important for polarized cell growth and cell separation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 21:2449–2462.
- Blanchard RJ, Blanchard DC (1969) Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. *Journal of comparative and physiological psychology* 68:129–135.
- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31–39.
- Bothos J, Tuttle RL, Ottey M, Luca FC, Halazonetis TD (2005) Human LATS1 is a mitotic exit network kinase. *Cancer research* 65:6568–6575.
- Brace J, Hsu J, Weiss EL (2011) Mitotic exit control of the *Saccharomyces cerevisiae* Ndr/LATS kinase Cbk1 regulates daughter cell separation after cytokinesis. *Molecular and cellular biology* 31:721–735.
- Brown MC, Eble JA, Calvete JJ, Marcinkiewicz C (2009) Structural requirements of KTS-disintegrins for inhibition of alpha(1)beta(1) integrin. *The Biochemical journal* 417:95–101.
- Caswell P, Norman J (2008) Endocytic transport of integrins during cell migration and invasion. *Trends in cell biology* 18:257–263.
- Caswell PT, Vadrevu S, Norman JC (2009) Integrins: masters and slaves of endocytic transport. *Nature reviews. Molecular cell biology* 10:843–853.
- Chan CS, Chen H, Bradley A, Dragatsis I, Rosenmund C, Davis RL (2010) α 8-integrins are required for hippocampal long-term potentiation but not for hippocampal-dependent learning. *Genes, brain, and behavior* 9:402–410.
- Chan CS, Levenson JM, Mukhopadhyay PS, Zong L, Bradley A, Sweatt JD, Davis RL (2007) Alpha3-integrins are required for hippocampal long-term potentiation and working memory. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 14:606–615.
- Chan CS, Weeber EJ, Kurup S, Sweatt JD, Davis RL (2003) Integrin requirement for hippocampal synaptic plasticity and spatial memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:7107–7116.
- Chan CS, Weeber EJ, Zong L, Fuchs E, Sweatt JD, Davis RL (2006) Beta 1-integrins are required for hippocampal AMPA receptor-dependent synaptic transmission, synaptic plasticity, and working memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:223–232.
- Chan EHY, Nousiainen M, Chalamalasetty RB, Schäfer A, Nigg EA, Silljé HHW (2005) The Ste20-like kinase Mst2 activates the human large tumor suppressor kinase Lats1. *Oncogene* 24:2076–2086.
- Chavis P, Westbrook G (2001) Integrins mediate functional pre- and postsynaptic maturation at a hippocampal synapse. *Nature* 411:317–321.
- Chen Y, Bourne J, Pieribone VA, Fitzsimonds RM (2004) The role of actin in the regulation of dendritic spine morphology and bidirectional synaptic plasticity. *Neuroreport* 15:829–832.

- Cingolani LA, Goda Y (2008) Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nature reviews. Neuroscience* 9:344–356.
- Cingolani LA, Thalhammer A, Yu LMY, Catalano M, Ramos T, Colicos MA, Goda Y (2008) Activity-dependent regulation of synaptic AMPA receptor composition and abundance by beta3 integrins. *Neuron* 58:749–762.
- Clegg DO, Wingerd KL, Hikita ST, Tolhurst EC (2003) Integrins in the development, function and dysfunction of the nervous system. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 8:d723–50.
- Cooper JA (1987) Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *The Journal of cell biology* 105:1473–1478.
- Cornils H, Stegert MR, Hergovich A, Hynx D, Schmitz D, Dirnhofer S, Hemmings BA (2010) Ablation of the kinase NDR1 predisposes mice to the development of T cell lymphoma. *Science signaling* 3:ra47.
- Craig DH, Gayer CP, Schaubert KL, Wei Y, Li J, Laouar Y, Basson MD (2009) Increased extracellular pressure enhances cancer cell integrin-binding affinity through phosphorylation of beta1-integrin at threonine 788/789. *American journal of physiology. Cell physiology* 296:C193–204.
- Crino PB, Eberwine J (1996) Molecular characterization of the dendritic growth cone: regulated mRNA transport and local protein synthesis. *Neuron* 17:1173–1187.
- Crusio WE, Schwegler H (1987) Hippocampal mossy fiber distribution covaries with open-field habituation in the mouse. *Behavioural brain research* 26:153–158.
- Danscher G, Zimmer J (1978) An improved Timm sulphide silver method for light and electron microscopic localization of heavy metals in biological tissues. *Histochemistry* 55:27–40.
- Das M, Wiley DJ, Chen X, Shah K, Verde F (2009) The conserved NDR kinase Orb6 controls polarized cell growth by spatial regulation of the small GTPase Cdc42. *Current biology : CB* 19:1314–1319.
- DeLellis RA, Merk FB, Deckers P, Warren S, Balogh K (1973) Ultrastructure and in vitro growth characteristics of a transplantable rat pheochromocytoma. *Cancer* 32:227–235.
- Devroe E, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Silver PA (2004) Human Mob proteins regulate the NDR1 and NDR2 serine-threonine kinases. *The Journal of biological chemistry* 279:24444–24451.
- Diana G, Valentini G, Travaglione S, Falzano L, Pieri M, Zona C, Meschini S, Fabbri A, Fiorentini C (2007) Enhancement of learning and memory after activation of cerebral Rho GTPases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:636–641.
- Dillon C, Goda Y (2005) The actin cytoskeleton: integrating form and function at the synapse. *Annual review of neuroscience* 28:25–55.

- Doyère V, Debiec J, Monfils MH, Schafe GE, LeDoux JE (2007) Synapse-specific reconsolidation of distinct fear memories in the lateral amygdala. *Nature neuroscience* 10:414–416.
- Dvash E, Kra-Oz G, Ziv C, Carmeli S, Yarden O (2010) The NDR kinase DBF-2 is involved in regulation of mitosis, conidial development, and glycogen metabolism in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic cell* 9:502–513.
- Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ (2008) The ADAM metalloproteinases. *Molecular aspects of medicine* 29:258–289.
- Emoto K, He Y, Ye B, Grueber WB, Adler PN, Jan LY, Jan YN (2004) Control of dendritic branching and tiling by the Tricornered-kinase/Furry signaling pathway in *Drosophila* sensory neurons. *Cell* 119:245–256.
- Emoto K, Parrish JZ, Jan LY, Jan YN (2006) The tumour suppressor Hippo acts with the NDR kinases in dendritic tiling and maintenance. *Nature* 443:210–213.
- Eva R, Dassie E, Caswell PT, Dick G, French Constant C, Norman JC, Fawcett JW (2010) Rab11 and its effector Rab coupling protein contribute to the trafficking of beta 1 integrins during axon growth in adult dorsal root ganglion neurons and PC12 cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:11654–11669.
- Fang X, Adler PN (2010) Regulation of cell shape, wing hair initiation and the actin cytoskeleton by Trc/Fry and Wts/Mats complexes. *Developmental biology* 341:360–374.
- Faulkner RL, Low LK, Cheng HJ (2007) Axon pruning in the developing vertebrate hippocampus. *Developmental neuroscience* 29:6–13.
- Felding-Habermann B, Silletti S, Mei F, Siu CH, Yip PM, Brooks PC, Cheresch DA, O’Toole TE, Ginsberg MH, Montgomery AM (1997) A single immunoglobulin-like domain of the human neural cell adhesion molecule L1 supports adhesion by multiple vascular and platelet integrins. *The Journal of cell biology* 139:1567–1581.
- Ferguson SM, Brasnjo G, Hayashi M, Wölfel M, Collesi C, Giovedi S, Raimondi A, Gong LW, Ariel P, Paradise S, O’toole E, Flavell R, Cremona O, Miesenböck G, Ryan TA, Camilli Pd (2007) A selective activity-dependent requirement for dynamin 1 in synaptic vesicle endocytosis. *Science (New York, N.Y.)* 316:570–574.
- Fischer A, Sananbenesi F, Schrick C, Spiess J, Radulovic J (2004) Distinct roles of hippocampal de novo protein synthesis and actin rearrangement in extinction of contextual fear. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:1962–1966.
- Franklin KBJ, Paxinos G (2008) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* Academic Press/ Elsevier Inc., 3rd edition.
- Freir DB, Fedriani R, Scully D, Smith IM, Selkoe DJ, Walsh DM, Regan CM (2010) Abeta oligomers inhibit synapse remodelling necessary for memory consolidation. *Neurobiology of aging* .

- Frenz LM, Lee SE, Fesquet D, Johnston LH (2000) The budding yeast Dbf2 protein kinase localises to the centrosome and moves to the bud neck in late mitosis. *Journal of cell science* 113 Pt 19:3399–3408.
- Fukazawa Y, Saitoh Y, Ozawa F, Ohta Y, Mizuno K, Inokuchi K (2003) Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo. *Neuron* 38:447–460.
- Gale GD, Anagnostaras SG, Godsil BP, Mitchell S, Nozawa T, Sage JR, Wiltgen B, Fanselow MS (2004) Role of the basolateral amygdala in the storage of fear memories across the adult lifetime of rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:3810–3815.
- Gallegos ME, Bargmann CI (2004) Mechanosensory neurite termination and tiling depend on SAX-2 and the SAX-1 kinase. *Neuron* 44:239–249.
- Gaullier JM, Simonsen A, D'Arrigo A, Bremnes B, Stenmark H, Aasland R (1998) FYVE fingers bind PtdIns(3)P. *Nature* 394:432–433.
- Geng W, He B, Wang M, Adler PN (2000) The tricornered gene, which is required for the integrity of epidermal cell extensions, encodes the Drosophila nuclear DBF2-related kinase. *Genetics* 156:1817–1828.
- Giancotti FG, Tarone G (2003) Positional control of cell fate through joint integrin/receptor protein kinase signaling. *Annual review of cell and developmental biology* 19:173–206.
- Goslin K, Banker G (1990) Rapid changes in the distribution of GAP-43 correlate with the expression of neuronal polarity during normal development and under experimental conditions. *The Journal of cell biology* 110:1319–1331.
- Gotwals PJ, Chi-Rosso G, Ryan ST, Sizing I, Zafari M, Benjamin C, Singh J, Venyaminov SY, Pepinsky RB, Kotliansky V (1999) Divalent cations stabilize the alpha 1 beta 1 integrin I domain. *Biochemistry* 38:8280–8288.
- Gould RJ, Polokoff MA, Friedman PA, Huang TF, Holt JC, Cook JJ, Niewiarowski S (1990) Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 195:168–171.
- Grabham PW, Foley M, Umeojiako A, Goldberg DJ (2000) Nerve growth factor stimulates coupling of beta1 integrin to distinct transport mechanisms in the filopodia of growth cones. *Journal of cell science* 113 (Pt 17):3003–3012.
- Grabham PW, Goldberg DJ (1997) Nerve growth factor stimulates the accumulation of beta1 integrin at the tips of filopodia in the growth cones of sympathetic neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17:5455–5465.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology* 36:59–74.

- Graham FL, van der Eb AJ (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52:456–467.
- Green DR, Evan GI (2002) A matter of life and death. *Cancer cell* 1:19–30.
- Greene LA, Tischler AS (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73:2424–2428.
- Guillot PV, Roubertoux PL, Crusio WE (1994) Hippocampal mossy fiber distributions and intermale aggression in seven inbred mouse strains. *Brain research* 660:167–169.
- Gunning P, Weinberger R, Jeffrey P (1997) Actin and tropomyosin isoforms in morphogenesis. *Anatomy and embryology* 195:311–315.
- Hall A, Lalli G (2010) Rho and Ras GTPases in axon growth, guidance, and branching. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2:a001818.
- Hall MN (2008) mTOR-what does it do? *Transplantation proceedings* 40:S5–8.
- Harburger DS, Calderwood DA (2009) Integrin signalling at a glance. *Journal of cell science* 122:159–163.
- Hattori D, Millard SS, Wojtowicz WM, Zipursky SL (2008) Dscam-mediated cell recognition regulates neural circuit formation. *Annual review of cell and developmental biology* 24:597–620.
- Hayakawa A, Hayes SJ, Lawe DC, Sudharshan E, Tuft R, Fogarty K, Lambright D, Corvera S (2004) Structural basis for endosomal targeting by FYVE domains. *The Journal of biological chemistry* 279:5958–5966.
- Hayashi K, Ohshima T, Hashimoto M, Mikoshiba K (2007) Pak1 regulates dendritic branching and spine formation. *Developmental neurobiology* 67:655–669.
- He Y, Emoto K, Fang X, Ren N, Tian X, Jan YN, Adler PN (2005a) Drosophila Mob family proteins interact with the related tricornered (Trc) and warts (Wts) kinases. *Molecular biology of the cell* 16:4139–4152.
- He Y, Fang X, Emoto K, Jan YN, Adler PN (2005b) The tricornered Ser/Thr protein kinase is regulated by phosphorylation and interacts with furry during Drosophila wing hair development. *Molecular biology of the cell* 16:689–700.
- Heasman SJ, Ridley AJ (2008) Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9:690–701.
- Hergovich A, Bichsel SJ, Hemmings BA (2005) Human NDR kinases are rapidly activated by MOB proteins through recruitment to the plasma membrane and phosphorylation. *Molecular and cellular biology* 25:8259–8272.
- Hergovich A, Cornils H, Hemmings BA (2008) Mammalian NDR protein kinases: from regulation to a role in centrosome duplication. *Biochimica et biophysica acta* 1784:3–15.
- Hergovich A, Hemmings BA (2008) Mammalian NDR/LATS protein kinases in hippo tumor suppressor signaling. *BioFactors (Oxford, England)* 35:338–345.

- Hergovich A, Kohler RS, Schmitz D, Vichalkovski A, Cornils H, Hemmings BA (2009) The MST1 and hMOB1 tumor suppressors control human centrosome duplication by regulating NDR kinase phosphorylation. *Current biology : CB* 19:1692–1702.
- Hergovich A, Schmitz D, Hemmings BA (2006) The human tumour suppressor LATS1 is activated by human MOB1 at the membrane. *Biochemical and biophysical research communications* 345:50–58.
- Hergovich A, Stegert MR, Schmitz D, Hemmings BA (2006) NDR kinases regulate essential cell processes from yeast to humans. *Nature reviews. Molecular cell biology* 7:253–264.
- Hinshaw JE (2000) Dynamin and its role in membrane fission. *Annual review of cell and developmental biology* 16:483–519.
- Honkura N, Matsuzaki M, Noguchi J, Ellis-Davies GCR, Kasai H (2008) The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron* 57:719–729.
- Hou MC, Guertin DA, McCollum D (2004) Initiation of cytokinesis is controlled through multiple modes of regulation of the Sid2p-Mob1p kinase complex. *Molecular and cellular biology* 24:3262–3276.
- Hou MC, Wiley DJ, Verde F, McCollum D (2003) Mob2p interacts with the protein kinase Orb6p to promote coordination of cell polarity with cell cycle progression. *Journal of cell science* 116:125–135.
- Hu Y, Chuang JZ, Xu K, McGraw TG, Sung CH (2002) SARA, a FYVE domain protein, affects Rab5-mediated endocytosis. *Journal of cell science* 115:4755–4763.
- Huang Z, Shimazu K, Woo NH, Zang K, Müller U, Lu B, Reichardt LF (2006) Distinct roles of the beta 1-class integrins at the developing and the mature hippocampal excitatory synapse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:11208–11219.
- Humphries JD, Byron A, Humphries MJ (2006) Integrin ligands at a glance. *Journal of cell science* 119:3901–3903.
- Huveneers S, Danen EHJ (2009) Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *Journal of cell science* 122:1059–1069.
- Hynes RO (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110:673–687.
- Isgor C, Slomianka L, Watson SJ (2004) Hippocampal mossy fibre terminal field size is differentially affected in a rat model of risk-taking behaviour. *Behavioural brain research* 153:7–14.
- Jacobson BS, Branton D (1977) Plasma membrane: rapid isolation and exposure of the cytoplasmic surface by use of positively charged beads. *Science (New York, N. Y.)* 195:302–304.
- Jiménez-Velasco A, Román-Gómez J, Agirre X, Barrios M, Navarro G, Vázquez I, Prósper F, Torres A, Heiniger A (2005) Downregulation of the large tumor suppressor 2 (LATS2/KPM) gene is associated with poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia.

Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, *Leukemia Research Fund, U.K* 19:2347–2350.

John N, Krügel H, Frischknecht R, Smalla KH, Schultz C, Kreutz MR, Gundelfinger ED, Seidenbecher CI (2006) Brevican-containing perineuronal nets of extracellular matrix in dissociated hippocampal primary cultures. *Molecular and cellular neurosciences* 31:774–784.

Khaitlina SY (2001) Functional specificity of actin isoforms. *International review of cytology* 202:35–98.

Kim M, Carman CV, Springer TA (2003) Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science (New York, N. Y.)* 301:1720–1725.

Kiryushko D, Berezin V, Bock E (2004) Regulators of neurite outgrowth: role of cell adhesion molecules. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1014:140–154.

Kohler RS, Schmitz D, Cornils H, Hemmings BA, Hergovich A (2010) Differential NDR/LATS interactions with the human MOB family reveal a negative role for human MOB2 in the regulation of human NDR kinases. *Molecular and cellular biology* 30:4507–4520.

Köhrmann M, Haubensak W, Hemraj I, Kaether C, Lessmann VJ, Kiebler MA (1999) Fast, convenient, and effective method to transiently transfect primary hippocampal neurons. *Journal of neuroscience research* 58:831–835.

Koike-Kumagai M, Yasunaga Ki, Morikawa R, Kanamori T, Emoto K (2009) The target of rapamycin complex 2 controls dendritic tiling of *Drosophila* sensory neurons through the Tricornered kinase signalling pathway. *The EMBO journal* 28:3879–3892.

Komarnitsky SI, Chiang YC, Luca FC, Chen J, Toyn JH, Winey M, Johnston LH, Denis CL (1998) DBF2 protein kinase binds to and acts through the cell cycle-regulated MOB1 protein. *Molecular and cellular biology* 18:2100–2107.

Krucker T, Siggins GR, Halpain S (2000) Dynamic actin filaments are required for stable long-term potentiation (LTP) in area CA1 of the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:6856–6861.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.

Lamprecht R, Farb CR, Rodrigues SM, LeDoux JE (2006) Fear conditioning drives profilin into amygdala dendritic spines. *Nature neuroscience* 9:481–483.

Lamprecht R, LeDoux J (2004) Structural plasticity and memory. *Nature reviews. Neuroscience* 5:45–54.

Laxmi TR, Stork O, Pape HC (2003) Generalisation of conditioned fear and its behavioural expression in mice. *Behavioural brain research* 145:89–98.

LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. *Annual review of neuroscience* 23:155–184.

- Legate KR, Wickström SA, Fässler R (2009) Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes & development* 23:397–418.
- Lemons ML, Condic ML (2008) Integrin signaling is integral to regeneration. *Experimental neurology* 209:343–352.
- Lin CY, Lynch G, Gall CM (2005) AMPA receptor stimulation increases alpha5beta1 integrin surface expression, adhesive function and signaling. *Journal of neurochemistry* 94:531–546.
- Lodish H (2007) *Molecular Cell Biology* Palgrave Macmillan, 6th edition edition.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr ALRRJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 193:265–275.
- Lynch G, Rex CS, Gall CM (2007) LTP consolidation: substrates, explanatory power, and functional significance. *Neuropharmacology* 52:12–23.
- Mah AS, Jang J, Deshaies RJ (2001) Protein kinase Cdc15 activates the Dbf2-Mob1 kinase complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:7325–7330.
- Mantzur L, Joels G, Lamprecht R (2009) Actin polymerization in lateral amygdala is essential for fear memory formation. *Neurobiology of learning and memory* 91:85–88.
- Maren S, Quirk GJ (2004) Neuronal signalling of fear memory. *Nature reviews. Neuroscience* 5:844–852.
- Marrs GS, Honda T, Fuller L, Thangavel R, Balsamo J, Lilien J, Dailey ME, Arregui C (2006) Dendritic arbors of developing retinal ganglion cells are stabilized by beta 1-integrins. *Molecular and cellular neurosciences* 32:230–241.
- Matus A (2000) Actin-based plasticity in dendritic spines. *Science (New York, N. Y.)* 290:754–758.
- Matus A (2005) Growth of dendritic spines: a continuing story. *Current opinion in neurobiology* 15:67–72.
- McCollum D, Gould KL (2001) Timing is everything: regulation of mitotic exit and cytokinesis by the MEN and SIN. *Trends in cell biology* 11:89–95.
- McGaugh JL (2000) Memory—a century of consolidation. *Science (New York, N. Y.)* 287:248–251.
- McGeachie AB, Cingolani LA, Goda Y (2011) A stabilising influence: Integrins in regulation of synaptic plasticity. *Neuroscience research* .
- Millward T, Cron P, Hemmings BA (1995) Molecular cloning and characterization of a conserved nuclear serine(threonine) protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:5022–5026.
- Millward TA, Heizmann CW, Schäfer BW, Hemmings BA (1998) Calcium regulation of Ndr protein kinase mediated by S100 calcium-binding proteins. *The EMBO journal* 17:5913–5922.

- Millward TA, Hess D, Hemmings BA (1999) Ndr protein kinase is regulated by phosphorylation on two conserved sequence motifs. *The Journal of biological chemistry* 274:33847–33850.
- Minichiello L, Korte M, Wolfer D, Kühn R, Unsicker K, Cestari V, Rossi-Arnaud C, Lipp HP, Bonhoeffer T, Klein R (1999) Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron* 24:401–414.
- Mishra A, Eathiraj S, Corvera S, Lambright DG (2010) Structural basis for Rab GT-Pase recognition and endosome tethering by the C2H2 zinc finger of Early Endosomal Autoantigen 1 (EEA1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:10866–10871.
- Moresco EMY, Donaldson S, Williamson A, Koleske AJ (2005) Integrin-mediated dendrite branch maintenance requires Abelson (Abl) family kinases. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:6105–6118.
- Moser M, Legate KR, Zent R, Fässler R (2009) The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science (New York, N.Y.)* 324:895–899.
- Mülhardt C (2008) *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics* Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, 6. auflage edition.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 51 Pt 1:263–273.
- Nader K, Hardt O (2009) A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nature reviews. Neuroscience* 10:224–234.
- Nasse MJ, Woehl JC (2010) Realistic modeling of the illumination point spread function in confocal scanning optical microscopy. *Journal of the Optical Society of America. A, Optics, image science, and vision* 27:295–302.
- Nelson B, Kurischko C, Horecka J, Mody M, Nair P, Pratt L, Zougman A, McBroom LDB, Hughes TR, Boone C, Luca FC (2003) RAM: a conserved signaling network that regulates Ace2p transcriptional activity and polarized morphogenesis. *Molecular biology of the cell* 14:3782–3803.
- Ng T, Shima D, Squire A, Bastiaens PI, Gschmeissner S, Humphries MJ, Parker PJ (1999) PKC α regulates beta1 integrin-dependent cell motility through association and control of integrin traffic. *The EMBO journal* 18:3909–3923.
- Nikonenko I, Toni N, Moosmayer M, Shigeri Y, Muller D, Sargent Jones L (2003) Integrins are involved in synaptogenesis, cell spreading, and adhesion in the postnatal brain. *Brain research. Developmental brain research* 140:185–194.
- Nilsson S, Kaniowska D, Brakebusch C, Fässler R, Johansson S (2006) Threonine 788 in integrin subunit beta1 regulates integrin activation. *Experimental cell research* 312:844–853.

- Parsons RG, Gafford GM, Baruch DE, Riedner BA, Helmstetter FJ (2006) Long-term stability of fear memory depends on the synthesis of protein but not mRNA in the amygdala. *The European journal of neuroscience* 23:1853–1859.
- Pawlow JP (1903) *Experimental psychology and the psycho-pathology of animals*, Vol. 7 Bull. of the Imperial Medical Acad.
- Pearce LR, Komander D, Alessi DR (2010) The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nature reviews. Molecular cell biology* 11:9–22.
- Pellinen T, Ivaska J (2006) Integrin traffic. *Journal of cell science* 119:3723–3731.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (1985) Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of neuroscience methods* 14:149–167.
- Pinkstaff JK, Detterich J, Lynch G, Gall C (1999) Integrin subunit gene expression is regionally differentiated in adult brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:1541–1556.
- Pinkstaff JK, Lynch G, Gall CM (1998) Localization and seizure-regulation of integrin beta 1 mRNA in adult rat brain. *Brain research. Molecular brain research* 55:265–276.
- Plantman S, Patarroyo M, Fried K, Domogatskaya A, Tryggvason K, Hammarberg H, Cullheim S (2008) Integrin-laminin interactions controlling neurite outgrowth from adult DRG neurons in vitro. *Molecular and cellular neurosciences* 39:50–62.
- Pollard TD, Borisy GG (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112:453–465.
- Ponchon L, Dumas C, Kajava AV, Fesquet D, Padilla A (2004) NMR solution structure of Mob1, a mitotic exit network protein and its interaction with an NDR kinase peptide. *Journal of molecular biology* 337:167–182.
- Prior H, Schwegler H, Marashi V, Sachser N (2004) Exploration, emotionality, and hippocampal mossy fibers in nonaggressive AB/Gat and congenic highly aggressive mice. *Hippocampus* 14:135–140.
- Ray S, Kume K, Gupta S, Ge W, Balasubramanian M, Hirata D, McCollum D (2010) The mitosis-to-interphase transition is coordinated by cross talk between the SIN and MOR pathways in *Schizosaccharomyces pombe*. *The Journal of cell biology* 190:793–805.
- Renaudin A, Lehmann M, Girault J, McKerracher L (1999) Organization of point contacts in neuronal growth cones. *Journal of neuroscience research* 55:458–471.
- Rosentreter A, Hofmann A, Xavier CP, Stumpf M, Noegel AA, Clemen CS (2007) Coronin 3 involvement in F-actin-dependent processes at the cell cortex. *Experimental cell research* 313:878–895.
- Roux A, Uyhazi K, Frost A, Camilli Pd (2006) GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. *Nature* 441:528–531.
- Rumpel S, LeDoux J, Zador A, Malinow R (2005) Postsynaptic receptor trafficking underlying a form of associative learning. *Science (New York, N.Y.)* 308:83–88.

- Ruoslahti E (1996) Brain extracellular matrix. *Glycobiology* 6:489–492.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)* 239:487–491.
- Satoh D, Sato D, Tsuyama T, Saito M, Ohkura H, Rolls MM, Ishikawa F, Uemura T (2008) Spatial control of branching within dendritic arbors by dynein-dependent transport of Rab5-endosomes. *Nature cell biology* 10:1164–1171.
- Sauer B, Henderson N (1988) Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85:5166–5170.
- Schlessinger AR, Cowan WM, Swanson LW (1978) The time of origin of neurons in Ammon's horn and the associated retrohippocampal fields. *Anatomy and embryology* 154:153–173.
- Schmid RS, Anton ES (2003) Role of integrins in the development of the cerebral cortex. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* 13:219–224.
- Schmued L, Slikker W (1999) Black-gold: a simple, high-resolution histochemical label for normal and pathological myelin in brain tissue sections. *Brain research* 837:289–297.
- Schuster T, Krug M, Stalder M, Hackel N, Gerardy-Schahn R, Schachner M (2001) Immunoelectron microscopic localization of the neural recognition molecules L1, NCAM, and its isoform NCAM180, the NCAM-associated polysialic acid, beta1 integrin and the extracellular matrix molecule tenascin-R in synapses of the adult rat hippocampus. *Journal of neurobiology* 49:142–158.
- Schwegler H, Crusio WE (1995) Correlations between radial-maze learning and structural variations of septum and hippocampus in rodents. *Behavioural brain research* 67:29–41.
- Schwegler H, Crusio WE, Lipp HP, Heimrich B (1988a) Water-maze learning in the mouse correlates with variation in hippocampal morphology. *Behavior genetics* 18:153–165.
- Schwegler H, Heimrich B, Keller F, Renner P, Crusio WE (1988b) Strain-specific development of the mossy fiber system in organotypic cultures of the mouse hippocampus. *Neuroscience letters* 87:7–10.
- Schwegler H, Lipp HP (1983) Hereditary covariations of neuronal circuitry and behavior: correlations between the proportions of hippocampal synaptic fields in the regio inferior and two-way avoidance in mice and rats. *Behavioural brain research* 7:1–38.
- Shattil SJ, Kim C, Ginsberg MH (2010) The final steps of integrin activation: the end game. *Nature reviews. Molecular cell biology* 11:288–300.
- Shaw WV, Packman LC, Burleigh BD, Dell A, Morris HR, Hartley BS (1979) Primary structure of a chloramphenicol acetyltransferase specified by R plasmids. *Nature* 282:870–872.

- Shi Y, Ethell IM (2006) Integrins control dendritic spine plasticity in hippocampal neurons through NMDA receptor and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II-mediated actin reorganization. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:1813–1822.
- Sholl DA (1953) Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *Journal of anatomy* 87:387–406.
- Sibarita JB (2005) Deconvolution microscopy. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 95:201–243.
- Siegmund A, Wotjak CT (2006) Toward an animal model of posttraumatic stress disorder. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1071:324–334.
- Song W, Zinsmaier KE (2003) Endophilin and synaptojanin hook up to promote synaptic vesicle endocytosis. *Neuron* 40:665–667.
- St John MA, Tao W, Fei X, Fukumoto R, Carcangiu ML, Brownstein DG, Parlow AF, McGrath J, Xu T (1999) Mice deficient of Lats1 develop soft-tissue sarcomas, ovarian tumours and pituitary dysfunction. *Nature genetics* 21:182–186.
- Stawowy P, Margeta C, Blaschke F, Lindschau C, Spencer-Hänsch C, Leitges M, Biagini G, Fleck E, Graf K (2005) Protein kinase C epsilon mediates angiotensin II-induced activation of beta1-integrins in cardiac fibroblasts. *Cardiovascular research* 67:50–59.
- Stegert MR, Hergovich A, Tamaskovic R, Bichsel SJ, Hemmings BA (2005) Regulation of NDR protein kinase by hydrophobic motif phosphorylation mediated by the mammalian Ste20-like kinase MST3. *Molecular and cellular biology* 25:11019–11029.
- Stegert MR, Tamaskovic R, Bichsel SJ, Hergovich A, Hemmings BA (2004) Regulation of NDR2 protein kinase by multi-site phosphorylation and the S100B calcium-binding protein. *The Journal of biological chemistry* 279:23806–23812.
- Stenmark H, Aasland R, Toh BH, D'Arrigo A (1996) Endosomal localization of the autoantigen EEA1 is mediated by a zinc-binding FYVE finger. *The Journal of biological chemistry* 271:24048–24054.
- Stoppel C, Albrecht A, Pape HC, Stork O (2006) Genes and neurons: molecular insights to fear and anxiety. *Genes, brain, and behavior* 5 Suppl 2:34–47.
- Stork O, Stork S, Pape HC, Obata K (2001) Identification of genes expressed in the amygdala during the formation of fear memory. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N. Y.)* 8:209–219.
- Stork O, Zhdanov A, Kudersky A, Yoshikawa T, Obata K, Pape HC (2004) Neuronal functions of the novel serine/threonine kinase Ndr2. *The Journal of biological chemistry* 279:45773–45781.
- Suzuki K, Takahashi K (2003) Reduced cell adhesion during mitosis by threonine phosphorylation of beta1 integrin. *Journal of cellular physiology* 197:297–305.

- Takahashi Y, Miyoshi Y, Takahata C, Irahara N, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S (2005) Down-regulation of LATS1 and LATS2 mRNA expression by promoter hypermethylation and its association with biologically aggressive phenotype in human breast cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11:1380–1385.
- Tamaskovic R, Bichsel SJ, Rogniaux H, Stegert MR, Hemmings BA (2003) Mechanism of Ca²⁺-mediated regulation of NDR protein kinase through autophosphorylation and phosphorylation by an upstream kinase. *The Journal of biological chemistry* 278:6710–6718.
- Threadgill R, Bobb K, Ghosh A (1997) Regulation of dendritic growth and remodeling by Rho, Rac, and Cdc42. *Neuron* 19:625–634.
- Timm F (1958) Zur Histochemie der Schwermetalle; das Sulfid-Silberverfahren. *Deutsche Zeitschrift für die gesamte gerichtliche Medizin* 46:706–711.
- Tischler AS, Greene LA (1975) Nerve growth factor-induced process formation by cultured rat pheochromocytoma cells. *Nature* 258:341–342.
- Tomaselli KJ, Damsky CH, Reichardt LF (1988) Purification and characterization of mammalian integrins expressed by a rat neuronal cell line (PC12): evidence that they function as alpha/beta heterodimeric receptors for laminin and type IV collagen. *The Journal of cell biology* 107:1241–1252.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76:4350–4354.
- Tronson NC, Taylor JR (2007) Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nature reviews. Neuroscience* 8:262–275.
- Tsien RY (1998) The green fluorescent protein. *Annual review of biochemistry* 67:509–544.
- Utomo AR, Nikitin AY, Lee WH (1999) Temporal, spatial, and cell type-specific control of Cre-mediated DNA recombination in transgenic mice. *Nature biotechnology* 17:1091–1096.
- Vandekerckhove J, Deboben A, Nassal M, Wieland T (1985) The phalloidin binding site of F-actin. *The EMBO journal* 4:2815–2818.
- Varma RK, Kaushal R, Thomas GP, Junnarkar AY, Singh PP, Tripathi RM (1987) Evaluation of dimethyl sulfoxide as a solvent in pharmacological experiments. *Indian journal of experimental biology* 25:758–760.
- Vichalkovski A, Gresko E, Cornils H, Hergovich A, Schmitz D, Hemmings BA (2008) NDR kinase is activated by RASSF1A/MST1 in response to Fas receptor stimulation and promotes apoptosis. *Current biology : CB* 18:1889–1895.
- Wang YL (2007) Computational restoration of fluorescence images: noise reduction, deconvolution, and pattern recognition. *Methods in cell biology* 81:435–445.
- Warren S, Chute RN (1972) Pheochromocytoma. *Cancer* 29:327–331.

- Webb DJ, Zhang H, Majumdar D, Horwitz AF (2007) alpha5 integrin signaling regulates the formation of spines and synapses in hippocampal neurons. *The Journal of biological chemistry* 282:6929–6935.
- Weiss EL, Kurischko C, Zhang C, Shokat K, Drubin DG, Luca FC (2002) The *Saccharomyces cerevisiae* Mob2p-Cbk1p kinase complex promotes polarized growth and acts with the mitotic exit network to facilitate daughter cell-specific localization of Ace2p transcription factor. *The Journal of cell biology* 158:885–900.
- Wennerberg K, Fässler R, Wärmegård B, Johansson S (1998) Mutational analysis of the potential phosphorylation sites in the cytoplasmic domain of integrin beta1A. Requirement for threonines 788-789 in receptor activation. *Journal of cell science* 111 (Pt 8):1117–1126.
- Wigge P, McMahon HT (1998) The amphiphysin family of proteins and their role in endocytosis at the synapse. *Trends in neurosciences* 21:339–344.
- Williams JA (1992) Disintegrins: RGD-containing proteins which inhibit cell/matrix interactions (adhesion) and cell/cell interactions (aggregation) via the integrin receptors. *Pathologie-biologie* 40:813–821.
- Xiao P, Bahr BA, Staubli U, Vanderklish PW, Lynch G (1991) Evidence that matrix recognition contributes to stabilization but not induction of LTP. *Neuroreport* 2:461–464.
- Xu T, Wang W, Zhang S, Stewart RA, Yu W (1995) Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* lats gene encodes a putative protein kinase. *Development (Cambridge, England)* 121:1053–1063.
- Yabuta N, Okada N, Ito A, Hosomi T, Nishihara S, Sasayama Y, Fujimori A, Okuzaki D, Zhao H, Ikawa M, Okabe M, Nojima H (2007) Lats2 is an essential mitotic regulator required for the coordination of cell division. *The Journal of biological chemistry* 282:19259–19271.
- Yang X, Yu K, Hao Y, Li Dm, Stewart R, Insogna KL, Xu T (2004) LATS1 tumour suppressor affects cytokinesis by inhibiting LIMK1. *Nature cell biology* 6:609–617.
- Yao J, Qi J, Chen G (2006) Actin-dependent activation of presynaptic silent synapses contributes to long-term synaptic plasticity in developing hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:8137–8147.
- Yoshihara Y, Roo Md, Muller D (2009) Dendritic spine formation and stabilization. *Current opinion in neurobiology* 19:146–153.
- Zallen JA, Peckol EL, Tobin DM, Bargmann CI (2000) Neuronal cell shape and neurite initiation are regulated by the Ndr kinase SAX-1, a member of the Orb6/COT-1/warts serine/threonine kinase family. *Molecular biology of the cell* 11:3177–3190.
- Zerial M, McBride H (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2:107–117.
- Zhou Q, Xiao M, Nicoll RA (2001) Contribution of cytoskeleton to the internalization of AMPA receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:1261–1266.

Zimmer DB, Chaplin J, Baldwin A, Rast M (2005) S100-mediated signal transduction in the nervous system and neurological diseases. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)* 51:201–214.

Ziv C, Kra-Oz G, Gorovits R, März S, Seiler S, Yarden O (2009) Cell elongation and branching are regulated by differential phosphorylation states of the nuclear Dbf2-related kinase COT1 in *Neurospora crassa*. *Molecular microbiology* 74:974–989.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Oliver Stork für die Vergabe des interessanten Themas sowie für die intensive und hervorragende Betreuung während meiner Doktorarbeit bedanken. Dabei bin ich ihm besonders dafür dankbar, dass er mich seit Beginn meiner akademischen Laufbahn sowohl als Mentor mit seiner fachlichen Kompetenz sowie vielen anregenden Diskussionen als auch menschlich in freundschaftlichen Gesprächen fortwährend unterstützte.

Weiterhin danke ich meinen Kollegen der Abteilung Genetik und molekulare Neurobiologie des Instituts für Biologie für das hervorragende Arbeitsklima. Im Besonderen möchte ich mich dabei bei Dr. Anne Albrecht und Dr. Bettina Müller für das Korrekturlesen, den anregenden Kommentaren zu meiner Doktorarbeit sowie für die freundschaftliche Atmosphäre in unserem Büro bedanken. Ebenfalls danke ich Marlen Thieme und Jan Teuber für das Korrekturlesen meiner Doktorarbeit und für die freundschaftliche Zusammenarbeit. Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Jorge R. Bergado-Acosta für die Bereitstellung seiner Daten und ebenfalls für die freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken sowie Antje Koffi von Hoff, Franziska Webers, Diana Wolter und Simone Stork für die hervorragende technische Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente.

Weiterhin danke ich Dr. Stefanie Kliche aus dem Institut für Molekulare und Klinische Immunologie für die hervorragende kooperative Zusammenarbeit.

Prof. Dr. Herbert Schwegler und Andrea Kröber aus dem Institut für Anatomie danke ich für ihre Hilfe bei der Durchführung der Timm-Silbersulfid-Färbungen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Plamena Ihlow für ihre freundschaftliche Unterstützung und der Hilfe bei der Formatierung meiner Arbeit in LaTeX bedanken.

Im besonderen Maße möchte ich meiner Familie und meinem Freund Mirko Peglow von ganzem Herzen dafür danken, dass sie mir immer unterstützend zur Seite standen und viel Kraft und Freude gegeben haben. Daher sei diese Arbeit ihnen gewidmet.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zu dem Thema:

**Die funktionelle Bedeutung der Serin/Threonin-Kinase Ndr2 in
Integrin-Signalwegen für die
Differenzierung neuronaler Zellen**

selbständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben habe. Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades:

**doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Magdeburg, 20. Mai 2011

Dipl.-Biol. Kati Rehberg

Lebenslauf

Name	Kati Rehberg
Geburtsdatum	18. August 1981
Geburtsort	Magdeburg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Dienstadresse	Otto-von-Guericke Universität Magdeburg Fakultät für Naturwissenschaften Institut für Biologie Abteilung Genetik & Molekulare Neurobiologie Leipziger Strasse 44 D-39120 Magdeburg
Telefon	+ 49-391-67-55108
Email	kati.rehberg@ovgu.de
Schulbildung	
1988–1992	Pablo-Neruda Grundschule, Magdeburg
1992–2000	Werner-von-Siemens Gymnasium Magdeburg
2000	Abitur
Beruflicher Werdegang	
2000–2002	Grundstudium Biologie an der Universität Kassel, Vordiplom („Sehr gut“)
2002–2005	Hauptstudium Neurobiologie an der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg
2005	Diplom („Sehr gut“) Diplomarbeit: „Ndr2 vermittelte Signalwege und ihre Bedeutung für die Differenzierung neuronaler Zellen“ (Betreuer: Prof. Dr. Oliver Stork)
Seit 2006	Doktorandin in der Abteilung Genetik & Molekulare Neurobiologie Institut für Biologie, Otto-von-Guericke Universität Magdeburg, Betreuer: Prof. Dr. Oliver Stork

Stipendien

- 2006 Reisestipendium für das Symposium „1st Neurotrain Training Course“ in Wien, Österreich (Symposium im Rahmen des „5th FENS Forum of European Neuroscience“, Wien 2006)
- 2006–2008 Stipendium des DFG-Graduiertenkollegs 1167 „Zell-Zell-Kommunikation in Nerven- und Immunsystem: Topologische Organisation von Signalwegen“ der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg
- 2008 Reisestipendium für das Symposium „Cell-cell adhesion mechanisms: From development of synaptic networks to cognitive dysfunctions“ in Villar-sur-ollon, Schweiz (Symposium im Rahmen des „6th FENS Forum of European Neuroscience“, Genf 2008)

Lehrtätigkeit

- 2008/2009 Praktikum „Cellular Neurophysiology“ und „Basic Molecular and Cell Biology“
- 2009 Praktikum „Molecular and Cellular Neurobiology“
Grund- und Spezialpraktikum „Neurogenetics“
- 2009/2010 Seminar und Praktikum „Basic Molecular and Cell Biology“
Grundpraktikum „Grundlagen der Biologie“ des Bachelor-Studiengangs Biosystemtechnik
- 2010 Praktikum „Molecular and Cellular Neurobiology“
Betreuung von Studenten im Rahmen einer „Labrotation“
Grundpraktikum „Grundlagen der Biologie“ des Bachelor-Studiengangs Biosystemtechnik
Wenn nicht anders gekennzeichnet wurden die Lehrtätigkeiten im Rahmen des Master-Studiengangs „Integrative Neuroscience“ an der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg ausgeübt.

Mitgliedschaften

Deutschen Neurowissenschaftliche Gesellschaft (NWG)
Federation of European Neuroscience Societies (FENS)
Molecular and Cellular Cognition Society (MCCS)

Publikationsliste

Wissenschaftliche Artikel

Rehberg K, Bergado-Acosta JR, Koch JC, Stork O (2010) Disruption of fear memory consolidation and reconsolidation by actin filament arrest in the basolateral amygdala. *Neurobiology of Learning Memory*, 94: 117-26.

Publizierte Kongressbeiträge

Rehberg K and Stork O (2006) The serine/threonine kinase Ndr2 mediates integrin signalling to the cytoskeleton during neuronal differentiation. FENS Abstr., vol.3, A193.20. (*Poster*)

Rehberg K and Stork O (2007) Critical role of actin filament dynamics in the consolidation and reconsolidation of fear memory. IBANGS Annual Meeting, Genes, Brain and Behavior, Abstr. pp. 66, 2007. (*Poster*)

Rehberg K and Stork O (2007) Ndr2 as a mediator of neuronal differentiation: interaction with actin filaments and integrin signalling. 2nd Westerburg Symposium, Abstr. pp. 52. (*Poster*)

Rehberg K and Stork, O. (2008) The serine/threonine kinase Ndr2 as a mediator of neuronal differentiation: interaction with integrins. FENS Satellite Symposium: Cell-cell adhesion mechanisms: From development of synaptic networks to cognitive dysfunction, Abstr. P12, pp. 37. (*Poster*)

Rehberg K and Stork, O. (2008) The serine/threonine kinase Ndr2 as a mediator of neuronal differentiation: interaction with integrins. FENS Abstr., vol.4, 142.26. (*Poster*)

Rehberg K and Stork O (2009) The serine/threonine kinase Ndr2 mediates integrin signaling to the cytoskeleton during neuronal differentiation. Program No. 312.14/B30. 2009 Neuroscience Meeting Planner. Chicago, IL: Society for Neuroscience, Online. (*Poster*)

Rehberg K, Bergado-Acosta JR, Schwegler H, Stork O (2010) Transgenic expression of the serine/threonine kinase Ndr2 increases hippocampal mossy fibre density and enhances open field exploration in mice. FENS Abstr., vol.5, 101.29. (*Poster*)

Bergado-Acosta JR, **Rehberg K**, Koch JC, Stork O (2010) Disruption of fear memory consolidation and reconsolidation by actin filament arrest in the basolateral amygdala. FENS Abstr., vol.5, 057.8. (*Poster*)