

***Der Beitrag von Neurofascin zur Entstehung und
Lokalisation von Gephyrinclustern während der
inhibitorischen Synaptogenese im ZNS***

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim

Institut für Zoologie

Abteilung Molekularbiologie, NMI-Naturwissenschaftliches und
Medizinisches Institut an der Universität Tübingen

vorgelegt von

Nadine Kerstin Burkarth

aus *Mutlangen*

2008

Dekan: Prof. Dr. H. Breer

1. berichtende Person: PD Dr. Hansjürgen Volkmer

2. berichtende Person: Prof. Dr. Harald Rösner

Eingereicht am: 09.01.2008

Tag der mündlichen Prüfung: 24.04.2008

Die vorliegende Arbeit wurde am 07.03.2008 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

Erklärung

Erklärung nach §8 Abs. 2 der Promotionsordnung vom 15. April 2005

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation selbständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle Stellen der Arbeit, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen oder aus anderweitigen fremden Äußerungen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Ferner erkläre ich, dass nicht bereits früher oder gleichzeitig ein Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens unter Vorlage der hier eingereichten Dissertation gestellt wurde.

Nadine Burkarth

Stuttgart, den 09.01.2008

Was wir wissen, ist ein Tropfen; was wir nicht wissen, ein Ozean.

Isaac Newton (1643 – 1727)

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	1
1 EINLEITUNG	2
1.1 Chemische Synapsen	2
1.1.1 Hauptkomponenten exzitatorischer und inhibitorischer Synapsen und die Rolle postsynaptischer Gerüstproteine	3
1.2 Zelladhäsionsmoleküle (CAMs)	6
1.2.1 Funktion von CAMs bei der Synaptogenese.....	6
1.2.1.1 Cadherine	7
1.2.1.2 Integrine	7
1.2.1.3 Neuroligine und Neurexine	8
1.2.1.4 Dystroglycan	9
1.3 Zelladhäsionsmoleküle der Ig-Superfamilie (IgCAMs)	10
1.3.1 Charakteristische Domänen.....	10
1.3.1.1 Immunglobulinähnliche Domänen (Ig-Domänen)	10
1.3.1.2 Fibronectin Typ-III (FN-III) ähnliche Domänen	10
1.3.1.3 Membranverankerung.....	10
1.3.2 Unterfamilien	11
1.3.3 Der Beitrag von IgCAMs auf die exzitatorische Synaptogenese	12
1.3.3.1 SynCAM (Synaptic Cell Adhesion Molecule)-Unterfamilie	12
1.3.3.2 NCAM-Unterfamilie	12
1.3.4 Der Beitrag von IgCAMs für die inhibitorische Synaptogenese	13
1.3.4.1 L1-Unterfamilie.....	13
1.3.4.2 Neurofascin.....	13
1.4 Zielsetzung	16
2 MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 Chemikalien	17
2.2 Puffer und Lösungen	17
2.3 Zellkulturmedien	20
2.4 Präparationsbesteck	22
2.5 Zelllinien	22

2.6	Methoden	23
2.6.1	Molekulargenetische Methoden	23
2.6.1.1	Restriktionsanalyse	23
2.6.1.2	Ligation von DNA-Fragmenten	23
2.6.1.3	Agarosegelelektrophorese	23
2.6.1.4	Transformation von Bakterien.....	24
2.6.1.5	Plasmid-DNA Präparation aus Bakterien.....	24
2.6.1.6	RNA-Isolierung aus HEK293-Zellen	25
2.6.1.7	RNA-Isolierung aus Gehirnlisat und hippokampalen Neuronen	25
2.6.1.8	DNase Verdau	25
2.6.1.9	Reverse Transkription (RT) - PCR.....	25
2.6.1.10	Bestimmung der DNA- bzw. RNA-Konzentration	26
2.6.1.11	Polymerasekettenreaktion - PCR	26
2.6.1.12	<i>Real-Time</i> quantitative PCR	27
2.6.1.13	Inhibierung der Genexpression mittels shRNA.....	29
2.6.2	Zellkultur.....	30
2.6.2.1	Beschichtung von Deckgläsern	30
2.6.2.2	Präparation und Kultivierung primärer hippokampaler Neurone aus der Ratte.....	31
2.6.2.3	Transfektion von Zellen.....	33
2.6.3	Plasmidkarten	34
2.6.4	Immunzytochemie	35
2.6.4.1	Antikörperliste	35
2.6.4.2	Immunfärbung von primären Neuronen.....	36
2.6.4.3	Kolokalisationsanalyse.....	36
2.6.5	Statistik.....	36
2.6.6	Mikroskopische Auswertung und Bildanalyse.....	37
3	ERGEBNISSE	38
3.1	Immunzytologische Charakterisierung dissoziierter Neurone aus dem Hippokampus....	38
3.1.1	Etablierung neuronaler Polarität <i>in vitro</i>	38
3.1.2	Expression von IgCAMs.....	41
3.1.2.1	Neurofascin.....	41
3.1.2.2	NCAM und L1	42
3.1.3	Expression synaptischer Proteine.....	42
3.1.3.1	Expression prä- und postsynaptischer Proteine zu frühen Entwicklungszeitpunkten ..	43
3.1.3.2	Expression prä- und postsynaptischer Proteine zu späten Entwicklungszeitpunkten..	45
3.1.3.3	Expression von GABA _A -Rezeptoren.....	47
3.2	Expressionsdynamik von Neurofascin und Gephyrin im Verlauf der Entwicklung hippokampaler Neurone <i>in vitro</i>.....	48
3.2.1	Lokalisation von Neurofascin und Gephyrin im Verlauf der Entwicklung	48

3.2.2	Expression von Neurofascin während der Entstehung von Gephyrinclustern.....	49
3.3	Einfluß der Neurofascin-Isoformen NF166 und NF186 auf frühe Prozesse der inhibitorischen Synaptogenese.....	51
3.3.1	Expression von Neurofascin-Isoformen im Hippokampus	51
3.3.2	Lokalisation heterolog exprimierter Neurofascin-Isoformen in hippocampalen Neuronen	53
3.3.3	Einfluß heterolog exprimierter Neurofascin-Isoformen auf die Entstehung von Gephyrinclustern	54
3.3.4	Einfluß heterolog exprimierter Neurofascin-Isoformen auf die Entstehung von exzitatorischen postsynaptischen Strukturen.....	55
3.4	Einfluß der extrazellulären und zytoplasmatischen Domäne Neurofascins auf die Entstehung von Gephyrinclustern	57
3.5	Einfluß von Punktmutationen in der zytoplasmatischen Domäne Neurofascins auf die Entstehung von Gephyrinclustern	59
3.6	Einfluß des shRNA-vermittelten Knockdowns von Neurofascin auf frühe Prozesse der Synaptogenese.....	61
3.6.1	Prävalidierung Neurofascin-spezifischer shRNA-Vektoren in HEK293-Zellen	61
3.6.2	Validierung Neurofascin-spezifischer shRNA-Vektoren in hippocampalen Neuronen	63
3.6.2.1	Quantifizierung des Neurofascin-Knockdowns in primären Neuronen.....	63
3.6.2.2	Einfluß Neurofascin-spezifischer shRNA-Vektoren auf die Expression verwandter IgCAMs am Beispiel von L1.....	64
3.6.3	Funktionelle Charakterisierung des Neurofascin-Knockdowns	65
3.6.3.1	Einfluß des Neurofascin-Knockdowns auf die Entstehung von Gephyrinclustern in hippocampalen Neuronen.....	65
3.6.3.2	Einfluß des Neurofascin-Knockdowns auf die Lokalisation von Gephyrinclustern in hippocampalen Neuronen.....	66
3.6.4	Nachweis der Spezifität Neurofascin-gerichteter shRNAs auf funktioneller Ebene.....	68
3.6.4.1	Integrität des Axoninitialsegmentes nach shRNA-vermitteltem Neurofascin-Knockdown	68
3.6.4.2	Bestimmung der Anzahl exzitatorischer Strukturen auf Dendriten nach Neurofascin-Knockdown	69
3.6.4.3	„Rescue“ anomal lokalisierter Gephyrincluster durch Koexpression von NF166	70
3.7	Untersuchung der Interaktion zwischen Neurofascin und Gephyrin	71
3.7.1	Einfluß von Neurofascin auf die Aggregation von GFP-Gephyrin am AIS hippocampaler Neurone.....	71
3.7.2	Koexpression von Neurofascin und GFP-Gephyrin in PC12E2- bzw. HEK293-Zellen	74

4	DISKUSSION	76
4.1	Hippokampale „Low-Density“ Neuronenkultur als <i>in vitro</i> -Modellsystem für die Untersuchung früher Prozesse der inhibitorischen Synaptogenese	77
4.2	Expression von Neurofascin zu frühen Zeitpunkten der inhibitorischen Synaptogenese	78
4.3	Expression entwicklungsabhängig exprimierter Neurofascin-Isoformen für die inhibitorische Synaptogenese	80
4.4	Einfluß extrazellulärer Interaktionen auf die Entstehung von Gephyrinclustern.....	82
4.5	Untersuchung der Interaktion von Neurofascin und Gephyrin.....	86
4.6	Potentielle Mechanismen der Gephyrincluster-Bildung bzw. -Lokalisation durch Neurofascin-vermittelte Signaltransduktion	88
4.7	Ausblick	90
5	DANKSAGUNG	92
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	93
7	PUBLIKATIONEN	95
7.1	Publikationen.....	95
7.2	Kongressbeiträge	95
8	LITERATURVERZEICHNIS	96
	LEBENS LAUF	107

ZUSAMMENFASSUNG

Membrangebundene CAMs stellen Schlüsselkomponenten bei der Entstehung exzitatorischer Synapsen im ZNS dar. Bislang war wenig zu deren Rolle bei der Entstehung inhibitorischer Synapsen bekannt. Insbesondere der funktionelle Zusammenhang zwischen CAMs und der Clusterbildung des postsynaptischen Gerüstproteins Gephyrin, das die Akkumulation von GABA_A-Rezeptoren an inhibitorischen Postsynapsen steuert, muss noch aufgeklärt werden. Neurofascin gehört zur L1-Unterfamilie der Immunglobulin-ähnlichen CAMs (IgCAMs). *In vivo* wurde gezeigt, dass es die Entstehung und Lokalisation von GABAergem Input an zerebellären Purkinje-Neuronen reguliert. Neurofascin stellt deshalb ein aussichtsvolles Kandidatenmolekül für die Rekrutierung von Gephyrin an inhibitorische Postsynapsen dar.

Zu frühen Entwicklungszeitpunkten korrelierten die Bildung von Gephyrinclustern und ihre Translokation an den Axonhügel mit der Expression von Neurofascin auf dem Soma und AIS dissoziierter hippocampaler Neurone. Des Weiteren wurde zu frühen Zeitpunkten der Synaptogenese hauptsächlich eine Neurofascin-Isoform exprimiert, der die fünfte Fibronectin-III ähnliche Domäne fehlt (NF-5^{te} FN-III). Im Gegensatz dazu wurde die Isoform NF+5^{te} FN-III erst im adulten Rattengehirn exprimiert.

Die Transfektion von Expressionsvektoren unterschiedlicher Neurofascin-Isoformen bzw. Deletionsmutanten ergab, dass die embryonale Isoform NF-5^{te} FN-III notwendig für die Gephyrinclusterbildung ist. Dieser Prozess scheint von extrazellulären Interaktionspartnern auf prä- bzw. postsynaptischen Komponenten abhängig zu sein. Gegenwärtig ist die Identität eines Neurofascin-Interaktionspartners jedoch unbekannt. Punktmutationen in der zytoplasmatischen Domäne Neurofascins deuten darauf hin, dass dieses durch Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden die Clusterbildung von Gephyrin induziert.

Mittels shRNA-vermitteltem Knockdown wurde gezeigt, dass Neurofascin notwendig für die Translokation von Gephyrin an den Axonhügel hippocampaler Neurone ist. Überdies ist Neurofascin sogar hinreichend für die funktionelle Wiederherstellung anomal lokalisierter Gephyrincluster nach Neurofascin-Knockdown. Die Expression von NF-5^{te} FN-III resultierte in einer Akkumulation exogen exprimierten GFP-Gephyrins. Dies deutet auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen Neurofascin und Gephyrin hin. Kolokalisationsstudien in HEK293- bzw. PC12E2-Zellen lieferten jedoch keinen Hinweis für eine direkte Neurofascin-Gephyrin-Interaktion, die zu den beobachteten Effekten führt.

1 EINLEITUNG

Das menschliche Gehirn besitzt etwa 10^{12} Nervenzellen. Jede Nervenzelle bildet durchschnittlich 1000 synaptische Kontakte mit anderen Neuronen aus. Dadurch entsteht ein komplexes neuronales Netzwerk, welches etwa 10^{15} Synapsen umfasst. Diese steuern die Gesamtheit aller Gehirnfunktionen. Angefangen von einfacheren motorischen Aufgaben bis hin zu komplexem emotionalen und kognitiven Verhalten. Die außergewöhnliche Spezifität der neuronalen Verschaltung im adulten Gehirn wird in mehreren Schritten erzielt. Neuronale Vorläuferzellen, sogenannte Neuroblasten, migrieren aus der aktiven Proliferationszone zu ihrem endgültigen Bestimmungsort. Dort erfolgt die Differenzierung der Zellen, die durch Bildung von Dendriten und Axonen gekennzeichnet ist. Die auswachsenden Axone wandern zum Teil über große Distanzen in ihr Zielgebiet und kontaktieren dort aus einer Vielzahl von Zellen schließlich individuelle Zielzellen. Nach Herstellung eines ersten Kontaktes zwischen Axon und Zielzelle erfolgt die Differenzierung prä- und postsynaptischer Endigungen und damit die Ausbildung einer funktionellen Synapse (Kandel *et al.*, 1996).

1.1 Chemische Synapsen

Synapsen stellen spezialisierte Zell-Zellkontakte dar (Brose, 1999; Scheiffele, 2003). Diese bestehen aus einer präsynaptischen axonalen Endigung und einem postsynaptischen Dendriten, Zellkörper oder Axon. Die häufigste Form der Signalübertragung im Nervensystem ist die chemische (Hyman, 2005). Dabei führt ein präsynaptisches Aktionspotential zur Freisetzung eines Botenstoffes, des Neurotransmitters, aus Vesikeln der Präsynapse. Dieser diffundiert durch den synaptischen Spalt und bindet an Rezeptoren der postsynaptischen Membran. Ligandengesteuerte Ionenkanäle, sogenannte ionotrope Neurotransmitter-Rezeptoren, sind für die schnelle Signalweiterleitung auf postsynaptischer Seite verantwortlich (Isaacson, 2000). Je nach Ionenselektivität depolarisieren oder hyperpolarisieren sie die postsynaptische Zelle und lösen so ein exzitatorisches oder inhibitorisches Potential aus. An der postsynaptischen Membran liegen diese Rezeptoren angereichert als „Cluster“ vor (Craig *et al.*, 1994). Die Signalübertragung an chemischen Synapsen ist unidirektional. Die Effizienz einer Synapse hängt dabei von einer präzisen topographischen Zusammensetzung und funktionellen Abstimmung der prä- und postsynaptischen Membrankomponenten ab (Sanes & Lichtman, 2001). Anfänglich angelegte synaptische Kontakte können im Verlauf der Entwicklung sowohl stabilisiert als auch eliminiert werden (Goda & Davis, 2003). In manchen

Regionen des Nervensystems werden diese jedoch zeitlebens umarrangiert, was für ein hohes Maß an neuronaler Plastizität sorgt (Stepanyants *et al.*, 2002; Trachtenberg *et al.*, 2002).

1.1.1 Hauptkomponenten exzitatorischer und inhibitorischer Synapsen und die Rolle postsynaptischer Gerüstproteine

Der wichtigste erregende Neurotransmitter im Zentralnervensystem (ZNS) ist Glutamat. Desse Rezeptoren (GluRs) werden aufgrund unterschiedlicher physiologischer Eigenschaften in zwei Hauptgruppen eingeteilt, die ionotropen (iGluR) und die metabotropen (mGluR) Glutamatrezeptoren (Gomperts *et al.*, 2000). Beide Rezeptorgruppen liegen meist gemeinsam in einer gemischten postsynaptischen Dichte (PSD) vor (Abbildung 1). Die Zusammensetzung der PSD exzitatorischer Synapsen wurde biochemisch untersucht (Kennedy, 1997; Collins *et al.*, 2006). NMDA-Rezeptoren und Kalzium-Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII) stellen Schlüsselkomponenten der PSD exzitatorischer Synapsen dar. Daneben wurden Proteine der **Membran-assoziierten Guanylat Kinase (MAGUK)**-Familie mit dem bekanntesten Vertreter PSD-95 identifiziert (Collins *et al.*, 2006). MAGUK-Proteine interagieren direkt mit NMDA- bzw. AMPA-Rezeptoren und verankern diese mit dem Zytoskelett (Kim & Sheng, 2004). PSD-95 enthält drei PDZ-Domänen (*PSD-95/Discs large/Zona occludens-1*). Diese stellen modulare Proteininteraktionsdomänen dar und sind auf die Bindung C-terminaler Peptidmotive anderer Proteine sowie anderer PDZ-Domänen spezialisiert (Nourry *et al.*, 2003).

Es gibt Hinweise für eine Rolle von PSD-95 bei der Synaptogenese. So wird PSD-95 in hippocampalen Neuronen zeitlich vor den NMDA-Rezeptoren an der Postsynapse angereichert (Rao *et al.*, 1998). In nicht-neuronalen Zellen induziert PSD-95 das Clustern von heterooligomeren NMDA-Rezeptoren in Mikroaggregaten (Kim *et al.*, 1998). Eine Überexpression von PSD-95 in hippocampalen Neuronen führt des Weiteren zu einer schnelleren Reifung exzitatorischer Synapsen (El-Husseini *et al.*, 2000). Eine weitere Rolle kommt PSD-95 bei Prozessen der Signaltransduktion zu. PSD-95 interagiert mit transmembranären Zelladhäsionsmolekülen, wie Neuroliginen, sowie einer Reihe von Signalmolekülen (Prange *et al.*, 2004). Es verbindet so Membranproteine mit zytoplasmatischen Signalwegen (Garner *et al.*, 2000).

Die wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter im ZNS sind γ -Amino-Buttersäure (GABA) und Glyzin. GABAerge Synapsen finden sich im gesamten ZNS, glyzinerge jedoch vor allem im Hirnstamm und Rückenmark (Malosio *et al.*, 1991). Bei Glyzin- (GlyR) und GABA_A-Rezeptoren handelt es sich um ligandengesteuerte Ionenkanäle.

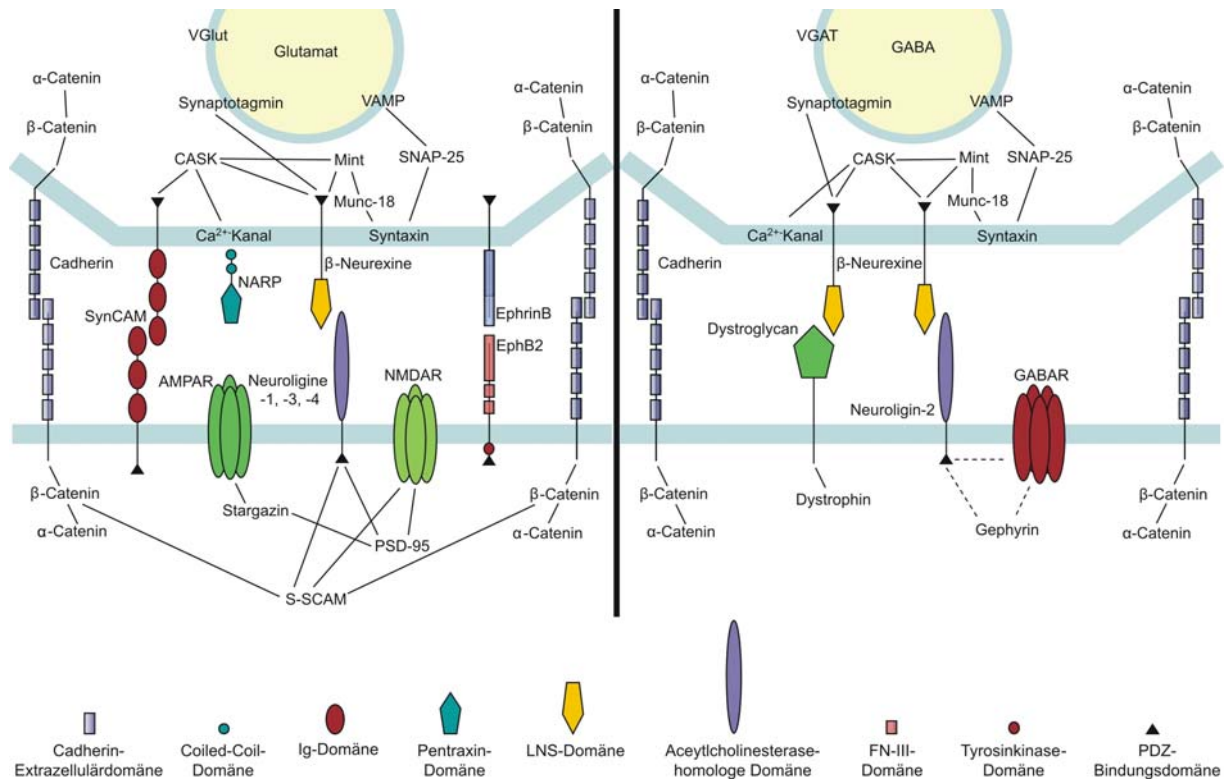


Abbildung 1 - Molekulare Komponenten glutamaterger und GABAerger Synapsen nach Craig et al. (2006). Ausgewählte Komponenten der prä- und postsynaptischen Membran sind dargestellt, darunter ebenfalls Transmembranproteine und ihre Interaktionspartner. Durchgehende Linien stellen wissenschaftlich beschriebene Protein-Protein-Interaktionen dar. Gestrichelte Linien repräsentieren vermutete indirekte Interaktionen.

Bisher wurden nur wenige Komponenten des postsynaptischen Komplexes inhibitorischer Synapsen identifiziert, da eine biochemische Isolierung nicht möglich war. Im Gegensatz zu exzitatorischen Synapsen fehlen inhibitorischen Synapsen PDZ-Domänen enthaltende Proteine. Das Tubulin-bindende Protein Gephyrin, welches zusammen mit Glyzin-Rezeptoren erstmals von Pfeiffer et al. (1982) isoliert wurde, ist ein Gerüstprotein, das selektiv im postsynaptischen Komplex inhibitorischer Synapsen vorkommt. Damit stellt es einen vielversprechenden Kandidaten dar, der für das Clustern von Glyzin- und GABA_A-Rezeptoren sowie deren Verankerung mit dem Zytoskelett verantwortlich sein könnte. Auf der Grundlage struktureller Analysen wird angenommen, dass Gephyrin ein hexagonales Gerüst nach spontaner Oligomerisierung ausbildet, an dem später Glyzin- und GABA_A-Rezeptoren akkumulieren (Kneussel & Betz, 2000). Gephyrin besteht im Wesentlichen aus zwei für die Oligomerisierung wichtigen Domänen, die E- und G-Domänen, welche über eine zentrale Polylinker Region C verbunden sind. Die Auflösung der Kristallstruktur der G-Domäne zeigte, dass diese in Lösung Trimere bildet, wohingegen die E-Domäne dimerisieren kann (Giesemann et al., 2003; Anderson et al., 2004). Collybistin, ein Rho-GEF (*GTP/GDP exchange factor*), reguliert den Aggregationszustand von Gephyrin über bislang unbekannte Mechanismen (Giesemann et al., 2003).

Die Bedeutung von Gephyrin für die inhibitorische Synaptogenese wurde durch Untersuchungen bestätigt, die zeigten, dass die Clusterbildung von Glyzin-Rezeptoren in Gephyrin-defizienten Mäusen ausbleibt (Kneussel *et al.*, 1999; Levi *et al.*, 2004). Analog dazu führte die Anwendung spezifischer „Antisense“-Oligonukleotide gegen Gephyrin in hippokampalen Kulturen zu einer beträchtlichen Reduktion von GABA_A-Rezeptortypen, die die γ 2-Untereinheit enthielten. Dies deutete darauf hin, dass Gephyrin auch bei der Clusterbildung von GABA_A-Rezeptoren beteiligt ist (Essrich *et al.*, 1998). Umgekehrt ist für die Mehrheit GABA-erger Synapsen das Vorhandensein der γ 2-Untereinheit eine Voraussetzung für das Clustern von Gephyrin (Essrich *et al.*, 1998). Des Weiteren wurde festgestellt, dass sich in hippokampalen Neuronenkulturen die Mobilität rekombinanter GFP-GABA_A-Rezeptoren zum Nachteil einer Clusterbildung in der Plasmamembran erhöhte, wenn die Gephyrin-Expression durch RNA-Interferenz herunterreguliert wurde. Dies führte zum Schluß, dass GABA_A-Rezeptoren durch Gephyrin stabilisiert werden (Aravin & Tuschl, 2005). Gephyrin interagiert direkt mit der β -Untereinheit von Glyzin-Rezeptoren (Allison *et al.*, 2000). Maas *et al.* (2006) konnten zeigen, dass der Transport dieser Gephyrin-Glyzin-Rezeptorkomplexe in Dendriten Dynein-abhängig gesteuert wird. Obwohl eine direkte Interaktion von GABA_A-Rezeptoren und Gephyrin bisher jedoch nicht nachgewiesen werden konnte, wird die allgemeine Auffassung vertreten, dass Gephyrin als Gerüstprotein für die Verankerung von Glyzin- und GABA_A-Rezeptoren im postsynaptischen Komplex fungiert.

1.2 Zelladhäsionsmoleküle (CAMs)

In den letzten Jahrzehnten lag der Fokus der Entwicklungsneurobiologie auf der Untersuchung sehr früher Phasen der ZNS-Entwicklung. Ziel war es, molekulare Mechanismen der Axonnavigation und der axonalen Wegfindung zu entschlüsseln. Dies führte zur Identifizierung mehrerer Zelladhäsionsmolekülklassen und löslicher Proteine (Chiba & Keshishian, 1996; Goodman, 1996; Volkmer *et al.*, 1996; Volkmer *et al.*, 1998; Pruss *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu waren Mechanismen, die die Entstehung und Stabilisierung von Synapsen regulieren, nahezu unbekannt. In den letzten Jahren rückten Zelladhäsionsmoleküle (**Cell Adhesion Molecules - CAMs**) als Schlüsselkomponenten von ZNS-Synapsen in den Vordergrund der wissenschaftlichen Untersuchungen.

CAMs vermitteln Zell-Zell-Kontakte bzw. Zell-Matrix-Kontakte in multizellulären Organismen und Geweben. Es handelt sich meist um transmembrane Glykoproteine, deren extrazelluläre Domäne Interaktionen mit Molekülen benachbarter Zellmembranen vermittelt (Alberts *et al.*, 1995). Handelt es sich dabei um die gleichen Interaktionspartner, so spricht man von einer homophilen Interaktion. Dagegen spricht man von einer heterophilen Interaktion, wenn unterschiedliche Moleküle miteinander wechselwirken. Die zytoplasmatische Domäne von CAMs interagiert mit dem Zytoskelett und ist hauptverantwortlich für die Vermittlung intrazellulärer Kommunikation (Aplin *et al.*, 1998).

1.2.1 Funktion von CAMs bei der Synaptogenese

CAMs dienen zu Beginn der ZNS-Entwicklung bei der axonalen Wegfindung als Leitmoleküle und helfen bei der Erkennung der korrekten Zielzelle (Scheiffele, 2003; Akins & Biederer, 2006). Des Weiteren sind CAMs an frühen Prozessen der Synaptogenese beteiligt. So tragen diese zur Bildung korrekt zusammengesetzter Synapsen bei, indem diese einen ersten Kontakt zwischen kompatiblen prä- und postsynaptischen Komponenten herstellen (Goda & Davis, 2003; Gerrow & El-Husseini, 2006). Nach Ausbildung des Initialkontaktes stabilisieren CAMs die Verbindung zwischen Membranen der Axonendigung und der postsynaptischen Zelle. Durch Modulation der Signaltransduktion können CAMs die Reifung von Synapsen beeinflussen. Dies führt schließlich zur Rekrutierung prä- und postsynaptischer Proteine wie Gerüstproteinen und Neurotransmitterrezeptoren bzw. synaptischen Vesikeln an die reifende Synapse (Goda & Davis, 2003; Dalva *et al.*, 2007). CAMs ermöglichen auf diese Weise die Differenzierung prä- und postsynaptischer Komponenten und tragen so zur Entstehung funktioneller Synapsen bei.

An der Synaptogenese beteiligte Zelladhäsionsmoleküle stammen von unterschiedlichen Familien. Hierzu zählen z.B. Mitglieder der Cadherine und der Immunglobulinsuperfamilie (IgCAMs), aber auch Neuroligine sowie Neurexine und Integrine (Yamagata *et al.*, 2003; Washbourne *et al.*, 2004; Craig *et al.*, 2006; Dean & Dresbach, 2006). Das Wissen über ihre Rolle bei der Entstehung und Reifung exzitatorischer Synapsen hat in den letzten Jahren zugenommen. Welchen Beitrag CAMs jedoch bei der inhibitorischen Synaptogenese leisten, ist bisher unzureichend geklärt.

1.2.1.1 Cadherine

Mitglieder der Cadherin-Superfamilie vermitteln Adhäsionen benachbarter Membranen vorwiegend über homophile Interaktionen. Es handelt sich um kalziumabhängige Transmembranproteine, die am N-Terminus eine variable Anzahl an Cadherin-Ektodomänen (EC) besitzen, wohingegen der intrazelluläre C-Terminus bei allen Cadherinen identisch ist und an β -Catenin bindet. β -Catenin seinerseits verankert Cadherin mit dem Aktinzytoskelett. β -Catenine können über ihren C-Terminus auch PDZ-Domänen Proteine binden und dadurch deren Rekrutierung an die Synapse bewirken. Cadherine werden zu sehr frühen Zeitpunkten an naszenten Synapsen exprimiert. Die Überexpression einer dominant-negativen Form in jungen hippokampalen Neuronen führte zu einer gestörten Synapsenbildung, während dieser Effekt in älteren Kulturen sehr viel geringer war (Togashi *et al.*, 2002; Bozdagi *et al.*, 2004). Deshalb wird angenommen, dass Cadherine vor allem zu sehr frühen Entwicklungszeitpunkten bei der Kontaktstabilisierung und im Zuge der Synapsenbildung beteiligt sind. Nach der Ausbildung einer Synapse scheint die Rolle der Cadherine durch andere Adhäsionssysteme zumindest teilweise übernommen zu werden. Cadherine spielen vermutlich ebenfalls bei der Reifung exzitatorischer Synapsen eine spezifische Rolle, da deren Expression mit zunehmender Reifung auf exzitatorische Synapsen begrenzt ist (Benson & Tanaka, 1998).

1.2.1.2 Integrine

Integrine sind hauptverantwortlich für Zell-Matrix-Interaktionen und bilden als funktionelle Einheit Heterodimere aus. Diese bestehen aus einer α - und β -Untereinheit (Hynes, 1992). Die Integrinfamilie umfasst durch die Kombination von insgesamt 18 α -Untereinheiten mit acht verschiedenen β -Untereinheiten 24 unterschiedliche Heterodimere. Integrine sind an synaptischen Kontakten angereichert und für die funktionelle Reifung exzitatorischer Synapsen notwendig. So fanden Chavis & Westbrook (2001), dass eine durch Peptidmimetika hervor-

gerufene Blockade des Integrin-vermittelten Signallings die Rezeptorzusammensetzung zentraler exzitatorischer Synapsen veränderte.

1.2.1.3 Neuroligine und Neurexine

In nicht-neuronalen Zellen exprimierte Neuroligine lösten die Bildung präsynaptischer Strukturen in kokultivierten hippokampalen Neuronen aus (Scheiffele *et al.*, 2000). Diese Beobachtung führte zur Auffassung, dass CAMs Schlüsselmoleküle bei der Synaptogenese darstellen. Neuroligine sind Transmembranproteine, die postsynaptisch lokalisiert sind (Lise & El-Husseini, 2006). Mit einer großen Anzahl an Spleißvarianten stellen sie mögliche Kandidaten dar, die die Spezifität des Synapsentyps determinieren könnten. Die Herunterregulation der Neuroligin-Isoformen NL-1, NL-2 und NL-3 mittels RNA-Interferenz führte zu einem Verlust exzitatorischer und inhibitorischer Synapsen in hippokampalen Neuronen (Chih *et al.*, 2005). Hierbei reduzierte NL-2 im Vergleich zu den anderen Isoformen die Zahl inhibitorischer Synapsen am stärksten. Dies steht in Einklang mit dem Isoform-Verteilungsmuster im Gehirn, wo NL-2 hauptsächlich in inhibitorischen Synapsen angereichert ist und die Lokalisation der Hauptisoform NL-1 sich hauptsächlich auf exzitatorische Synapsen beschränkt (Song *et al.*, 1999; Varoqueaux *et al.*, 2004).

Ihre Funktion entfalten Neuroligine über Neurexine, die an der präsynaptischen Membran lokalisiert sind. Neurexine werden von drei Genen kodiert, Neurexin-1, -2 und -3. Durch alternatives Spleißen entstehen letztlich mehr als 1000 Isoformen (Missler & Sudhof, 1998). Der zytoplasmatische Teil von Neurexin enthält eine PDZ-Bindungsdomäne, durch welche Interaktionen mit präsynaptischen Gerüstproteinen stattfinden können und schließlich die Ausbildung der aktiven Zone ausgelöst wird. Die Bedeutung der Neuroligin-Neurexin Interaktion bei der Synaptogenese konnte in einer Reihe von *in vitro*-Experimenten gezeigt werden. So induzierte in Fibroblasten exprimiertes Neurexin-1 β die Bildung exzitatorischer und inhibitorischer Postsynapsen in Dendriten kokultivierter Neurone, indem es die Akkumulation von glutamatergen und GABAergen postsynaptischen Proteinen bewirkte (Graf *et al.*, 2004). Gleichermäßen war aufgereinigtes Neuroligin hinreichend, um Neurexin zu clustern und eine präsynaptische Differenzierung und Akkumulation präsynaptischer Vesikel hervorzurufen (Dean *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu inhibierte die Behandlung hippokampaler Neurone mit einem Fusionsprotein, welches die extrazelluläre Domäne von Neurexin-1 β enthielt, die Bildung exzitatorischer und inhibitorischer Synapsen (Levinson *et al.*, 2005). Des Weiteren wurde das Clustern des postsynaptischen Gerüstproteins PSD-95 durch die Expression einer dominant negativen NL-1-Isoform in kultivierten Neuronen gestört (Nam & Chen, 2005).

Diese Ergebnisse ließen zunächst vermuten, dass Neuroligine und Neurexine eine unerlässliche Rolle bei der Synapsenbildung spielen. Jedoch waren NL-1, -2 und -3 Einzel- bzw. Doppel-Knockout-Mäuse lebensfähig und fertil (Varoqueaux *et al.*, 2006). Des Weiteren zeigten Trippel-Knockout-Mäuse eine normale Zellarchitektur sowie eine normale synaptische Dichte und Synapsenmorphologie. Diese Mäuse starben zwar kurz nach der Geburt, Ursache hierfür war aber eine Dysfunktion des Atemzentrums im Stammhirn. In diesen Mäusen konnte des Weiteren ein verschobenes Gleichgewicht in Richtung glutamaterger Synapsen beobachtet werden. Dies führte zu einer erhöhten Exzitation und einer damit verbundenen Störung der rhythmischen Aktivität der respiratorischen Netzwerke (Varoqueaux *et al.*, 2006). Da sich in Abwesenheit von Neuroliginen dennoch *in vivo* Synapsen bilden, wird angenommen, dass Neuroligine zwar hinreichend, aber nicht essentiell für die Synaptogenese sind. *In vivo* sind Neuroligine vermutlich an der Regulation der Synapsenreifung und am Erhalt des Gleichgewichtes von exzitatorischen zu inhibitorischen Synapsen beteiligt.

1.2.1.4 Dystroglycan

Dystroglycan ist ein Transmembranprotein, welches aus einer extrazellulären α -Untereinheit und einer zytoplasmatischen β -Untereinheit besteht. Es ist in der postsynaptischen Dichte reifer inhibitorischer Synapsen lokalisiert und bindet intrazellulär Dystrophin (Williamson *et al.*, 1997) (Abbildung 1). Obwohl es ein Hauptinteraktionspartner von β -Neurexin ist, vermittelt es keine Neurexin-induzierte Aggregation von GABA_A-Rezeptoren bzw. Gephyrin (Sugita *et al.*, 2001). Studien mit Dystroglycan-defizienten Mäusen zeigten, dass dieses CAM nicht essentiell für die Entstehung inhibitorischer Synapsen ist. Es scheint vielmehr für deren Reifung wichtig zu sein (Levi *et al.*, 2002).

1.3 Zelladhäsionsmoleküle der Ig-Superfamilie (IgCAMs)

1.3.1 Charakteristische Domänen

1.3.1.1 Immunglobulinähnliche Domänen (Ig-Domänen)

Die Namensgebung der IgCAMs beruht auf dem Vorhandensein N-terminal lokalisierter Immunglobulin (Ig)-ähnlicher Domänen (Williams & Barclay, 1988; Williams *et al.*, 1989). Diese stellen ein weit verbreitetes Strukturmerkmal dar, welches erstmals bei Antikörpern (Immunglobulinen) des Immunsystems beschrieben wurde (Edelman, 1987). Ig-Domänen bilden antiparallele β -Faltblattstrukturen aus, welche aus alternierenden Bereichen hydrophober und hydrophiler Aminosäuren aufgebaut sind (Chothia *et al.*, 1998; Stoyanov *et al.*, 2000).

1.3.1.2 Fibronectin Typ-III (FN-III) ähnliche Domänen

Als zweites strukturelles Motiv der Ig-Superfamilie sind Fibronectin-Wiederholungseinheiten des Typs III (FN-III repeat) in variabler Anzahl zu finden. Dieses Motiv besitzt eine Länge von etwa 90 Aminosäuren und bildet eine siebensträngige, antiparallele β -Faltblattstruktur mit einem konservierten Tryptophan- und Tyrosinrest aus. Im Gegensatz zu den Ig-Domänen erfolgt keine Stabilisierung durch Disulfidbrücken (Collinson *et al.*, 1998). Das FN-III Motiv wurde ursprünglich im 450 kDa großen dimeren Molekül Fibronectin identifiziert. Dieses stellt einen Bestandteil der extrazellulären Matrix (ECM) dar und ist aus insgesamt 16 Fibronectin Typ I, -II, und -III Domänen aufgebaut. Fibronectindomänen und Ig-Domänen zeigen trotz Unterschieden in ihrer Aminosäuresequenz eine einheitliche dreidimensionale Struktur (β -Faltblatt) und werden zusammen mit den Ig-ähnlichen Domänen für Zellerkennungsprozesse verantwortlich gemacht.

1.3.1.3 Membranverankerung

Die Mehrheit der IgCAMs gehört zu den Typ I Transmembranproteinen, die über eine 25 Aminosäuren lange α -helikale Sequenz in der Plasmamembran verankert sind. An diese schließt sich C-Terminal ein hochkonservierter zytoplasmatischer Abschnitt an, der intrazellulär Signaltransduktion vermittelt (Brümmendorf & Rathjen, 1993). Die Verankerung von IgCAMs in der Zellmembran kann auch über einen Glykosylphosphatidinositol (GPI)-Anker

erfolgen. Dies schließt jedoch eine direkte Beteiligung an intrazellulären Signalkaskaden über bisher bekannte Mechanismen aus.

1.3.2 Unterfamilien

Die Ig-Superfamilie umfasst verschiedene Subfamilien, die unter anderem nach der Anzahl der Ig-Domänen, sowie nach Vorhandensein und Anzahl der FN-III repeats unterteilt werden (ausgewählte Subfamilien siehe Abbildung 2). Des Weiteren erfolgt die Zuordnung abhängig von der Art der Verankerung in der Membran. Mitglieder der GPI-verankerten Proteine mit

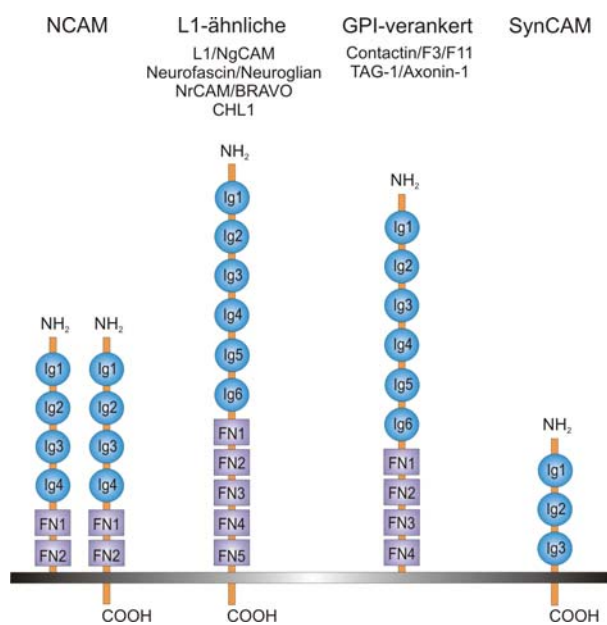


Abbildung 2 – Schematischer Aufbau ausgewählter Unterfamilien der IgCAMs. Für NCAM sind die transmembranäre und GPI-verankerte Isoform dargestellt. Der schwarze Balken repräsentiert die Zellmembran. Schrägstriche trennen Spezieshomologe. Ig: Ig-Domäne, FN: FN-III Domäne.

sechs Ig- und vier FN-III ähnlichen Domänen sind Contactin/F3/F11 und TAG-1 (Axonin-1 im Huhn). Das *Neural Cell Adhesion Molecule* (NCAM) kommt sowohl in GPI-verankerter als auch transmembranärer Form vor und wird zur NCAM-Subfamilie mit vier Ig- und zwei FN-III ähnlichen Domänen gezählt. Ferner gehören dieser Unterfamilie NCAM-verwandte Moleküle anderer Spezies, wie z.B. ApCAM (*Aplysia*) und Fasciclin II (*Drosophila*) an (Collinson *et al.*, 1998). Ein weiteres Mitglied der Ig-Superfamilie ist SynCAM. Dieses besitzt lediglich drei Ig-Domänen und wurde bisher nur in Synapsen nachgewiesen. Zur Unterfamilie der L1-ähnlichen IgCAMs gehören die membrangängigen Mitglieder L1, Neurofascin, NrCAM (*NgCAM related cell adhesion molecule*) und CHL1 (*close homologue of L1*) (Collinson *et al.*, 1998). Alle besitzen einen ähnlichen strukturellen Aufbau aus sechs Ig- und fünf FN-III ähnlichen Domänen, einer Transmembrandomäne und einer kurzen, hoch konservierten zytoplasmatischen Domäne. IgCAM-Homologe können bis hin zu den Invertebraten verfolgt werden, was ihre funktionelle Bedeutung sowohl innerhalb der Evolution als auch bei Zellerkennungsprozessen unterstreicht.

1.3.3 Der Beitrag von IgCAMs auf die exzitatorische Synaptogenese

1.3.3.1 SynCAM (Synaptic Cell Adhesion Molecule)-Unterfamilie

SynCAM ist sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert (Biederer *et al.*, 2002). SynCAM wird während der Entwicklung durch Glykosylierung reguliert und interagiert extrazellulär ausschließlich homophil, wodurch es die Bildung transzellulärer Verbindungen vermittelt. Intrazellulär bindet SynCAM an *CASK* (*Kalzium/Calmodulin-abhängige Serine Proteinkinase*). Neben Neuroligin gilt auch SynCAM als Induktor präsynaptischer Terminale. So induzierte in HEK293-Zellen exprimiertes SynCAM spezifisch die Differenzierung präsynaptischer Terminale in kokultivierten hippocampalen Neuronen. Hierbei verfügten die ausgebildeten präsynaptischen Terminale über eine spontane Aktivität und waren in der Lage Neurotransmitter freizusetzen (Sara *et al.*, 2005). Während Neuroligin-Neurexin-Interaktionen die synaptische Zahl erhöhten, verstärkte SynCAM spezifisch die Funktion exzitatorischer Synapsen.

1.3.3.2 NCAM-Unterfamilie

NCAM ist sowohl bei frühen Prozessen der Synaptogenese beteiligt als auch bei anschließenden Reifungsprozessen. Das CAM wird in drei Spleißvarianten exprimiert. Bei NCAM120 (120 kD) handelt es sich um eine GPI-verankerte Isoform, die bisher nur in Gliazellen identifiziert wurde. Daneben existieren die transmembranären neuronalen Isoformen NCAM140 (140 kD) und NCAM180 (180 kD). NCAM180 besitzt dabei die längste Intrazellulärdomäne und interagiert mit Spektrin (Pollerberg *et al.*, 1986; Pollerberg *et al.*, 1987). NCAM ist an der Organisation postsynaptischer Komplexe einschließlich PSD-95 beteiligt (Sytnyk *et al.*, 2006). So besitzen ein bis drei Tage kultivierte hippocampale Neurone an der Zelloberfläche NCAM-Cluster, die über Spektrin mit Organellen des Trans-Golgi Netzwerkes verbunden sind. Diese Komplexe werden innerhalb weniger Minuten an Stellen neugebildeter Initialkontakte transloziert (Sytnyk *et al.*, 2002). Zu späteren Entwicklungszeitpunkten (4-7. DIV = Day(s) *in vitro* = Tag(e) *in vitro*) regulieren die postsynaptischen NCAM-Level sowohl die Zahl als auch die Übertragungsstärke exzitatorischer Synapsen (Dityatev *et al.*, 2000). Durch Einsatz des NCAM-Peptidmimetikums FGL, dessen Bindung an den FGFR1 wie für NCAM beschrieben die Phosphorylierung dieses Rezeptors auslöst, konnte die Synapsenbildung *in vitro* sowie die Gedächtnisleistung behandelte Ratten gefördert werden (Cambon *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu zeigten NCAM-defiziente Mäuse Beeinträchtigungen ihres räumlichen Orientierungsvermögens sowie eine Reduktion der Langzeitpotenzierung (LTP), was eine Verminderung ihrer Lernfähigkeit zeigt (Bukalo *et al.*, 2004).

1.3.4 Der Beitrag von IgCAMs für die inhibitorische Synaptogenese

1.3.4.1 L1-Unterfamilie

L1-CAMs werden in fast allen differenzierenden Neuronen des ZNS exprimiert und stellen aussichtsreiche Kandidatenmoleküle bei Prozessen der inhibitorischen Synaptogenese dar. L1 kann sowohl die Funktion als auch die Zahl inhibitorischer Synapsen modulieren. So war in juvenilen L1-defizienten Mäusen die durch axosomatische GABAerge Synapsen vermittelte perisomatische Inhibition stark beeinträchtigt. Dies äußerte sich vor allem in einer Reduktion der Amplitude und Frequenz inhibitorischer postsynaptischer Ströme (IPSCs). Des Weiteren hatte die Zahl inhibitorischer Synapsen abgenommen (Saghatelyan *et al.*, 2004). Somit scheint L1 in frühen Entwicklungsprozessen beteiligt zu sein.

1.3.4.2 Neurofascin

Neurofascin wurde erstmals 1987 im Huhn beschrieben (Rathjen *et al.*, 1987). Der extrazelluläre Teil des IgCAMs besteht aus sechs Ig-ähnlichen und drei bis fünf FN-III ähnlichen Domänen. Als einziges Mitglied der L1-Unterfamilie besitzt Neurofascin zwischen der vierten und fünften FN-III ähnlichen Domäne eine **P**rolin-, **A**lanin- und **T**hreoninreiche (PAT)-Domäne aus 75 Aminosäuren. Diese PAT-Domäne kann O-glykosyliert werden, was zu einer gestreckten Konformation führt (Jentoft, 1990). Das Neurofascin-Gen besteht aus 33 Exons, die sich über 72 kb erstrecken. Die PAT-Domäne sowie jede der Ig- und FN-III ähnlichen Domänen werden von zwei Exons codiert (Hassel *et al.*, 1997).

Der Vorgang des alternativen Spleißens des CAMs Neurofascin spielt bei vielen verschiedenen Prozessen in der Entwicklung des Nervensystems eine große Rolle und führt zur Expression von mehr als 50 verschiedenen Neurofascin-Isoformen. Darunter sind drei Isoformen, NF155, NF166 und NF186 (NF185 in *G. gallus*) bislang detaillierter charakterisiert worden (Hassel *et al.*, 1997). Neurofascin NF166, welches sowohl homophile als auch heterophile Interaktionen mit NrCAM und Axonin-1 eingeht, induziert das Auswachsen von Neuriten des zentralen und peripheren Nervensystems (Pruss *et al.*, 2004). Von Gliazellen exprimiertes NF155 ist im Komplex mit axonalem Contactin und Paranodin/Caspr an der Entstehung der Paranodien an den Ranvierschen Schnürringen beteiligt. Axonales NF186 trägt zur Akkumulation von Na⁺-Kanälen an den Ranvierschen Schnürringen bei (Sherman *et al.*, 2005). Es ist somit bei der Etablierung der saltatorischen Erregungsleitung beteiligt. Dabei geht die Expression des neuronalen NF166 in dorsalen Hinterwurzelganglien derjenigen von

NF186 voraus. Die NF186-Expression wird zu späteren Entwicklungszeitpunkten hochreguliert (Pruss *et al.*, 2006). Des Weiteren wirkt sich NF186 inhibitorisch auf das Auswachsen von Neuriten aus, vermutlich weil es Interaktionen mit extrazellulären Liganden beeinträchtigt (Pruss *et al.*, 2006).

In zerebellären Purkinje-Zellen stellen die CAMs Neurofascin und NrCAM sowie Ankyrin_G, β IV-Spektrin und die β 1-Untereinheiten der Na⁺-Kanäle wichtige Komponenten des Axon-initialsegmentes (AIS) dar (Jenkins & Bennett, 2001). Auf diesem subzellulären Kompartiment erfolgt die Generierung von Aktionspotentialen und deren Weiterleitung. Die Expression von

Ankyrin_G ist entscheidend für die korrekte Lokalisation der AIS-Komponenten, einschließlich der von Neurofascin. Bisher wurde davon ausgegangen, dass es sich bei der axonal exprimierten Neurofascin-Isoform in der Ratte (*R. norvegicus*) um NF186 handelt (Ango *et al.*, 2004; McEwen & Isom, 2004). Ankyrin_G bindet dabei die unphosphorylierte Aminosäure Tyrosin im FIGQY-Motiv des zytosolischen Teiles von NF186 (Davis & Bennett, 1994; Zhang *et al.*, 1998). Es fungiert hierbei als Adaptormolekül zu Spektrin und dem Zytoskelett (Garver *et al.*, 1997; Tuvia *et al.*, 1997). Des Weiteren interagiert das C-terminale YSLA-Motiv von Neurofascin mit der zweiten PDZ-Domäne von Syntenin-1 (Koroll *et al.*, 2001). Dieses Gerüstprotein wird in Neuronen hauptsächlich in der Wachstums- und Synaptogenesephase exprimiert. Es interagiert des Weiteren mit Kainatrezeptoren und scheint bei der Entstehung und Reifung exzitatorischer Synapsen beteiligt zu sein (Hirbec *et al.*, 2005). Neueste Erkenntnisse weisen darauf hin, dass Neurofascin für die Anreicherung einer spezialisierten Brevican-enthaltenden extrazellulären Matrix am AIS hippocampaler Neurone verantwortlich ist (Hedstrom *et al.*, 2007).

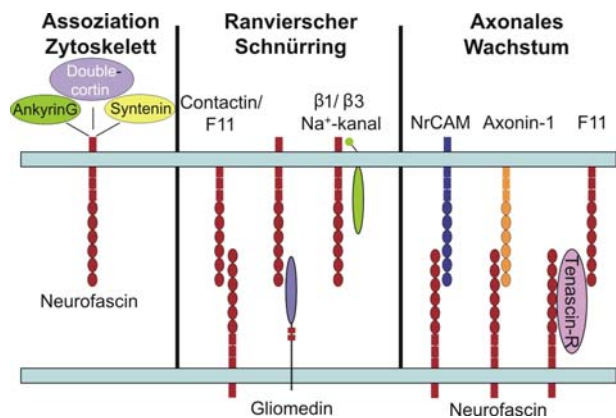


Abbildung 3 – Bislang bekannte Neurofascininteraktionen. Neurofascin (rot) bindet intrazellulär Ankyrin_G bzw. Doublecortin und wird über diese im Zytoskelett verankert. Ebenfalls wurde das PDZ-Domänen enthaltende Protein Syntenin-1 als Bindungspartner identifiziert. An Ranvierschen Schnürringen konnte eine Assoziation von axonalem NF186 mit glialem Gliomedin sowie mit β 1/ β 3-Untereinheiten der Na_v-Kanäle gezeigt werden. Für axonales Wachstum bedeutsam sind Neurofascin-Interaktionen mit NrCAM, Axonin-1 bzw. F11/Contactin über Tenascin-R.

Neurofascin und inhibitorische Synaptogenese

Im Jahr 2004 beschrieben Ango et al. erstmals einen möglichen Zusammenhang zwischen Neurofascin und der inhibitorischen Synaptogenese. Neurofascin wurde hier als notwendiger Faktor für die korrekte Lokalisierung inhibitorischer Synapsen an spezifischen subzellulären Kompartimenten von Purkinje-Neuronen beschrieben. Ango et al. (2004) fanden heraus, dass Neurofascin *in vivo* in einem subzellulären Gradienten entlang des Axons zerebellärer Purkinje-Zellen exprimiert wird. Dieser Gradient stellt möglicherweise ein Substrat für auswachsende Korbzellaxone dar und könnte für ein direktionales Wachstum der Korbzellaxone vom Purkinje-Soma in Richtung AIS sorgen. Die hohe Konzentration von Neurofascin am AIS wird durch Ankyrin_G hervorgerufen, dessen Lokalisation auf das AIS begrenzt ist. In Ankyrin_G-defizienten Purkinje-Zellen war der Neurofascin-Gradient aufgehoben. In der Folge verloren die Korbzellaxone ihr gerichtetes Wachstum zum AIS und wanderten stattdessen entlang der ektopischen Neurofascin-Verteilung (Ango *et al.*, 2004). Des Weiteren reduzierte eine dominant-negative Neurofascin-Mutante, welcher der extrazelluläre Teil fehlte, *in vivo* die Bildung GABAerger Synapsen am AIS. Ursache hierfür war eine Störung der Neurofascin-Ankyrin_G-Interaktion. Diese Experimente lieferten Hinweise dafür, dass Neurofascin bei der Festlegung synaptischer Verschaltungen an spezifischen subzellulären Kompartimenten mitwirkt.

1.4 Zielsetzung

Ein wichtiger Aspekt bei der Synaptogenese ist der funktionelle Zusammenhang zwischen CAMs und postsynaptischen Gerüstproteinen, die zu frühen Entwicklungszeitpunkten an der Ausbildung des postsynaptischen Apparates beteiligt sind. Im Gegensatz zu exzitatorischen Synapsen sind die Mechanismen einer CAM-induzierten inhibitorischen Synaptogenese sowie das Zusammenspiel mit zugehörigen Gerüstkomponenten bislang unzureichend aufgeklärt. So ist weitgehend unbekannt, zu welchen Entwicklungszeitpunkten die Induktion von Gephyrinclustern erfolgt, wodurch deren subzelluläre Lokalisation gesteuert wird und inwiefern CAMs an diesen Prozessen beteiligt sind. Dies soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit geklärt werden.

Da Neurofascin bei der Entstehung und Lokalisation GABAerger Synapsen *in vivo* eine Rolle zu spielen scheint, stellt dieses ein aussichtsvolles Kandidatenmolekül für die Rekrutierung von Gephyrin an inhibitorische Postsynapsen zu frühen Zeitpunkten der Synaptogenese dar. Um einen möglichen Beitrag von Neurofascin für die inhibitorische Synaptogenese im ZNS untersuchen zu können, soll zunächst mittels Immunzytochemie analysiert werden, ob zu frühen Zeitpunkten der inhibitorischen Synaptogenese eine zeitliche und räumliche Korrelation zwischen der Gephyrincluster-Bildung und der Neurofascin-Expression in dissoziierten hippocampalen Neuronen besteht.

Weiter gilt es zu untersuchen, ob Neurofascin bei der Induktion und Lokalisation von Gephyrinclustern beteiligt ist. Dies soll mit Hilfe von Überexpressionsstudien erfolgen. Ferner sollen Deletions- und Mutagenesestudien darüber Aufschluß geben, welche Rolle der Domänenaufbau Neurofascins für die Entstehung von Gephyrinclustern spielt. Ob Neurofascin eine für die Bildung und Lokalisation von Gephyrinclustern notwendige oder möglicherweise sogar hinreichende Komponente in sich entwickelnden Neuronen darstellt, soll mit Hilfe eines shRNA-vermittelten Funktionsverlustes von endogenem Neurofascin untersucht werden.

Alternatives Spleißen stellt einen bei CAMs weit verbreiteten Mechanismus dar. Eine detaillierte Expressionsanalyse der Neurofascin-Isoformen ist bislang jedoch nicht erbracht worden. Deshalb soll untersucht werden, welche Neurofascin-Isoformen im Verlauf der Entwicklung dissoziierter hippocampaler Ratteneurone exprimiert werden. Des Weiteren soll ihr Expressionsverlauf während der Entwicklung des Rattengehirnes analysiert werden. Es soll geklärt werden, welche Rolle differenziell exprimierte Neurofascin-Isoformen bei Prozessen der inhibitorischen Synaptogenese spielen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien

Chemikalien wurden in der Regel analysenrein von den Firmen Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München) bezogen. Abweichende Bezugsquellen sind im Text vermerkt. Sofern nicht anders beschrieben, wurde für alle Puffer, Lösungen, Medien und Reaktionen autoklaviertes Reinstwasser (18.3 MΩ/cm) verwendet.

2.2 Puffer und Lösungen

AP-Färbelösung

165 µg/ml NBT (BIOMOL GmbH, Hamburg; 06428)

83 µg/ml BCIP (BIOMOL GmbH, Hamburg; 02291)

in AP-Puffer

AP-Puffer

100 mM Tris-HCl, pH 9.5

0.01 mM ZnCl₂

5 mM MgCl₂

in H₂O

AP-Stopplösung

20 mM Tris-HCl, pH 8.0

5 mM EDTA

Blockierungsreagenz (10×)

100 g Blocking Reagent for ELISA (Roche Diagnostics, Mannheim)

in 100 ml H₂O auf dem Magnetrührer solubilisieren

DNA-Probenpuffer (5×)

40 % (w/v) Saccharose

0.05 % (w/v) Bromphenolblau

1 mM EDTA, pH 7.5-8

0.1 % (w/v) SDS

Ethidiumbromid-Lösung

10 mg/ml Ethidiumbromid
in H₂O

Fixierlösung

4 % (w/v) Paraformaldehyd (PFA) in PBS

LyseLösung (DNA-Minipräparation)

0.2 M NaOH
1 % SDS

Neutralisationslösung (DNA-Minipräparation)

4.09 M Guanidinhydrochlorid, pH 4.8
759 mM KCH₃CO₂
2.12 M Eisessigsäure

PBS

140 mM NaCl
2.6 mM KCl
1.4 mM KH₂PO₄
8.1 mM Na₂HPO₄

Permeabilisierungslösung

0.2 % (v/v) TritonX-100 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
in H₂O

Resuspensionslösung (DNA-Minipräparation)

50 mM Tris-HCl, pH 7.5
10 mM EDTA, pH 8.0
100 µg/ml RNase A

Säulen- Waschlösung (DNA-Minipräparation)

162.8 mM KCH₃CO₂
22.6 mM Tris-HCl, pH 7.5
0.109 mM EDTA, pH 8.0
Vor Gebrauch 95% Ethanol zugeben.

SDS-PAGE Probenpuffer (5x)

62.5 mM Tris, pH 6.8

25 mM EDTA, pH 6.8

5 % (w/v) SDS

5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol

0.025% (w/v) Bromphenolblau

50 % (v/v) Glycerol

SDS-PAGE Laufpuffer

10 % (v/v) SDS-PAGE Puffer (10x)

0.1 % (w/v) SDS

SDS-PAGE Puffer (10x)

250 mM Tris

1.92 M Glyzin

SDS-PAGE Transferpuffer

10 % (v/v) SDS-PAGE Puffer (10x)

20 % (v/v) Methanol

TA-Puffer (50×) (DNA-Gelpuffer)

2 M Tris

250 mM Natriumacetat

50 mM EDTA

pH 7.4 mit 96% (v/v) Essigsäure

TBST

50 mM Tris, pH 7.4

150 mM NaCl

0.5% (v/v) Tween™ 20

2.3 Zellkulturmedien

Die Medien, Zusätze für die Medien und Antibiotika für die Zellkultur wurden von den Firmen Cambrex (bezogen über BIOZYM Scientific GmbH, Hess Oldendorf) und PAA Laboratories GmbH (Cölbe) bezogen. Das fötale Kälberserum (FKS) und das Pferdeserum (HS) wurden vor Gebrauch eine Stunde bei 56° C inaktiviert. Die Zellkulturschalen und –flaschen wurden von der Firma Corning (über Fisher Scientific GmbH, Schwerte) und der Firma Nunc GmbH & Co. KG (Wiesbaden) bezogen.

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)

1 % (w/v) Difco™Bacto-Agar (Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg)

0.5 % (w/v) Difco™Bacto-Hefeextrakt (Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg)

0.8 % (w/v) NaCl

Autoklavieren

Agar-Platten

15 g Difco™Bacto-Agar (Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg)

in 1000 ml LB-Medium

Autoklavieren, bis 55° C abkühlen lassen und unter sterilen Bedingungen gießen

Selektions-Agarplatten

15 g Difco™Bacto-Agar (Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg)

in 1000 ml LB-Medium

Autoklavieren, bis 55 °C abkühlen lassen, Antibiotikum zugeben und unter sterilen Bedingungen gießen.

Kanamycinsulfat (1000×)

30 mg/ml Kanamycinsulfat

in H₂O, sterilfiltrieren

Boratpuffer

1.24 g H₃BO₃ (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)

1.90 g Na₂B₄O₇ (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)

in 400 ml H₂O, pH 8.5, sterilfiltriert

Poly-L-Lysin-(PLL)-Lösung (1mg/ml)

Poly-L-Lysin Hydrobromid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
in Boratpuffer, sterilfiltriert

DMEM-HS-Medium

450 ml DMEM w/o Natrium-Pyruvat, 4.5 g/l D-Glukose (Invitrogen, Karlsruhe)
50 ml Pferdeserum
5 ml Natrium-Pyruvat (100x)

Pyruvat-Lösung (100x)

1.1 g Natrium-Pyruvat
in 100 ml H₂O, sterilfiltriert

NaHCO₃ (5.5 %)

5.5 g NaHCO₃ (Merck, Bruchsal)
in 100 ml H₂O, sterilfiltriert

Glukose (20%)

20 g D(+)-Glukose-Monohydrat (Merck, Bruchsal)
80 ml H₂O, sterilfiltriert

Stabiles L-Glutamin (100x) (PromoCell GmbH, Heidelberg)

NMEM-B27-Medium

50 ml Minimal Essential Medium (10x) w/o L-Glutamin (Invitrogen, Karlsruhe)
5 ml Pyruvat-Lösung (100x)
5 ml Stabiles L-Glutamin (200 mM)
20 ml NaHCO₃ (5.5 %)
15 ml Glucose (20%)
10 ml B27 Supplement (Invitrogen, Karlsruhe)
in 500 ml H₂O, sterilfiltriert, max. 10 d bei 4°C haltbar

HBSS-Puffer

1000 ml HBSS (1x) mit Ca²⁺/Mg²⁺, ohne Phenolrot (Invitrogen, Karlsruhe)
7 ml HEPES (1M), pH 7.3
10 ml Penicillin-Streptomycin
sterilfiltriert

Trypsin-EDTA

100 ml Trypsin-EDTA (1×)
1 ml Hepes (1M), pH 7.3
1 ml Penicillin-Streptomycin
sterilfiltriert

HEK293-Medium

440 ml DMEM w/o L-Glutamin, 4,5 g/l D-Glukose
50 ml FKS
5 ml Penicillin-Streptomycin
5 ml L-Glutamin (200mM)

PC12E2-Medium

440 ml DMEM w/o L-Glutamin, 4,5 g/l D-Glukose
50 ml Pferdeserum
25 ml FKS
5 ml Penicillin-Streptomycin
5 ml L-Glutamin (200mM)

2.4 Präparationsbesteck

Die Instrumente zur Präparation embryonaler Hippokampi wurden von Fine Science Tools (FST, Heidelberg) bezogen.

Set #1: Bauchdeckenschere (FST #14007-14), Gewebs-Pinzette (FST #11021-14) zur Entnahme der Embryonen.

Set #2: Spatel, Irisschere zum Freilegen des Gehirnes (FST # 14060-11), gebogene Pinzette (Dumontstar #7, FST # 11297-10)

Set #3: Vannas Federschere (FST # 15001-08) zur Dissektion des Hippokampus, sehr feine gerade BioInox Pinzette (Dumont #5, FST# 11252-20)

Alle Instrumente wurden vor Gebrauch autoklaviert.

2.5 Zelllinien

HEK293-Zellen (*human*)

PC12E2-Zellen (*R. norvegicus*)

Primäre Neurone: hippocampale Neurone (E17) aus *R. norvegicus*

2.6 Methoden

2.6.1 Molekulargenetische Methoden

2.6.1.1 Restriktionsanalyse

Es wurden 20 µl Ansätze mit 1 µg *Plasmid-DNA*, der kompletten DNA einer PCR-Reaktion oder der DNA aus einer ausgeschnittenen Agarosegelbande angesetzt. Jede Restriktionsendonuklease (Fermentas GmbH, St. Leon - Rot oder New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) wurde in zehnfachem Überschuss eingesetzt (10 U pro Ansatz). Die Reaktionsansätze wurden mindestens 2 h bei der für das Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Auftrennung und Detektion der DNA-Fragmente erfolgte im Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel.

2.6.1.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde Isopropanol gefällte oder aus dem Agarosegel eluierte DNA verwendet. In den Vektor einzubauende DNA wurde in dreifach molarem Überschuss gegenüber dem Vektor eingesetzt. Die Ligationen wurden mit 400 U T4 DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 10 µl pro Ansatz bei 14 °C über Nacht in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffersystem durchgeführt.

2.6.1.3 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente können analytisch oder präparativ durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt werden. Dabei wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle durch das Gel von der Kathode zur Anode. Das Agarosegel enthielt 0.5 µg/ml Ethidiumbromid, wodurch die DNA-Banden im UV-Licht (365 nm) als leuchtende Banden sichtbar wurden. Diese Bandenmuster konnten so fotografisch dokumentiert werden. Kleine Fragmente bis 500 bp wurden in 1.5–2 % (w/v) Agarosegelen aufgetrennt. Größere Fragmente und Plasmide wurden in Gelen von 0.5 – 0.8 % (w/v) aufgetrennt. Verwendete Gelkammern waren LKB GNA100 (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden) und Fisherbrand® HK13 (FisherScientific GmbH, Schwerte). Vor Beladen des Agarosegels wurden den DNA-Proben jeweils 5 µl DNA-Probenpuffer zugegeben.

2.6.1.4 Transformation von Bakterien

Die Transformation beschreibt den Vorgang, bei dem fremde DNA in kompetente Bakterien eingeschleust wird. Bei der Hitzeschockmethode werden in die destabilisierte Bakterienmembran durch kurzzeitiges Erhitzen auf 42 °C Poren gerissen, durch welche die fremde DNA in die Zelle gelangen kann. Hierzu wurden bei -70 °C gelagerte rubidiumkompetente Bakterien (*E. coli* DH5 α) langsam auf Eis aufgetaut. Nach dem Auftauen wurde die DNA vorsichtig unter die Bakterien gemischt und die Bakterien 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein 40-sekündiger Hitzeschock bei 42 °C und anschließendes Abkühlen auf Eis. Nach Zugabe von 200 μ l LB-Medium ohne Antibiotika wurden die Bakterien für 30 min bei 37 °C inkubiert und danach auf einer Selektionsagarplatte ausgestrichen.

2.6.1.5 Plasmid-DNA Präparation aus Bakterien

DNA-Minipräparation

Zur schnellen Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde ein Protokoll verwendet, das auf der Methode der alkalischen Lyse basiert. Dazu wurde für die DNA-Minipräparation 1 ml LB-Selektionsmedium mit einem Bakterienklon angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Bakterienrührer inkubiert. Die Bakterien wurden pelletiert (3 min, 6.000 x g, RT) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 150 μ l Resuspensionslösung aufgenommen und die Bakterien durch Zugabe von 150 μ l Lyselösung lysiert. Die Neutralisation erfolgte durch Zugabe von 300 μ l Neutralisationslösung. An dieser Stelle fielen genomische DNA und ein Großteil der Proteine aus und konnte durch Zentrifugation (20 min, 12.000 x g, 4 °C) von der noch in Lösung befindlichen Plasmid-DNA abgetrennt werden. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation in ein neues Gefäß überführt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 600 μ l Isopropanol gefällt und abzentrifugiert (10 min, 12.000 x g, RT). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet durch Zugabe von 600 μ l 70 % (v/v) Ethanol und anschließender Zentrifugation (3 min, 12.000 x g, RT) gewaschen. Nach Entfernung des Überstandes und Trocknung des DNA-Pellets (10 min, 37 °C) wurde die DNA in 30 μ l Wasser aufgenommen. Die Konzentration der DNA wurde spektrophotometrisch bestimmt (s. 2.6.1.10)

DNA-Midipräparation

Zur Gewinnung von ca. 100 μ g oder größeren Mengen hochreiner Plasmid-DNA wurde das Pure Yield™-Plasmid Midiprep System (Promega, Mannheim) eingesetzt. Die Methode basiert auf einer alkalischen Lyse der Bakterien mit anschließender Reinigung der Plasmid-DNA über eine Anionenaustauschersäule. Das Vorgehen erfolgte nach Anleitung im Handbuch. Die Konzentration der DNA wurde spektrophotometrisch bestimmt (siehe 2.6.1.10).

2.6.1.6 RNA-Isolierung aus HEK293-Zellen

Bei allen Arbeiten mit RNA wurden Handschuhe getragen und frisch autoklavierte Gefäße und gestopfte Pipettenspitzen verwendet. Für die RNA-Isolierung wurde das RNEasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Zusammensetzung der Puffer lässt sich dem Handbuch entnehmen. Das Vorgehen erfolgte gemäß dem Handbuch wie folgt: nach Ernte von 10^6 -Zellen wurde das Zellpellet in 350 µl RLT-Puffer (+ β -Mercaptoethanol 10 µl/ml) aufgenommen, um die Zellen zu lysieren. Anschließend wurde der Ansatz in einem Rotator mit Vortex-Funktion vollständig homogenisiert. Nach Zugabe von 350 µl 70 % (v/v) Ethanol wurde die RNA über eine Affinitätschromatographiesäule (RNEasy Minicolumn) gereinigt, anschließend einmal mit 700 µl RW1-Puffer und zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen und mit 35 µl RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert. Die Konzentration der RNA wurde spektrophotometrisch, wie in 2.6.1.10 beschrieben, bestimmt.

2.6.1.7 RNA-Isolierung aus Gehirnlisat und hippocampalen Neuronen

Für die Homogenisierung von 100 mg Hemisphärengewebe wurde 1 ml RNA-STAT60™ (AMS Biotechnology) zugegeben und mit Hilfe einer Pasteurpipette trituriert. Hippokampale Neurone (5×10^6 -Zellen) wurden direkt durch Zugabe von 1 ml RNA-STAT60™ solubilisiert. Nach 5 min wurden 200 µl Chloroform pro ml Homogenat hinzupipettiert. Nachfolgend wurde der Ansatz 15 s lang geschüttelt und 15 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde durch Isopropanolfällung (500 µl pro 1 ml RNA-STAT60™) die Gesamt-RNA aus der wässrigen Phase extrahiert und mit 75 % (v/v) Ethanol gewaschen. Die nun gereinigte RNA wurde in RNAfreies Wasser aufgenommen. Die Konzentration der RNA wurde spektrophotometrisch, wie in 2.6.1.10 beschrieben, bestimmt.

2.6.1.8 DNase Verdau

Für den DNase-Verdau wurden 2 µl DNasepuffer (10x) (Promega, Mannheim) und 2 µl RQ1 DNase (2 Units, Promega) zu 16 µl RNA-Lösung aus 2.6.1.6 bzw. 2.6.1.7 pipettiert. Der Ansatz wurde anschließend 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 2 µl Stoppreagenz dazupipettiert und die DNase 10 min bei 65° C inaktiviert.

2.6.1.9 Reverse Transkription (RT) - PCR

Nach dem DNase-Verdau wurden 10 µl der RNA-Lösung aus 2.6.1.6 bzw. 2.6.1.7 zusammen mit 0.3 µl Primer (randomisierte Hexanukleotide, 150 µg/ml), 0.5 µl dNTPs (25mM) und 2.2 µl H₂O bei 70 °C 10 min lang inkubiert und im Anschluß 5 min auf Eis abgekühlt. Des Weiteren erfolgte die Zugabe von 1.5 µl 10 x RT-Puffer und 1.0 µl MoMuLV reverse Trans-

kriptase (New England Biolabs, Ipswich, MA, GB). Anschließend wurde der Ansatz 10 min bei 25° C inkubiert und die reverse Transkription 50 min bei 42 °C durchgeführt. Abgestoppt wurde die Reaktion durch Hitzedenaturierung des Enzyms (15 min bei 70 °C). Nachfolgend wurde durch Zugabe von 1 µl RNase H und 20-minütiger Inkubation bei 37 °C die RNA degradiert.

2.6.1.10 Bestimmung der DNA- bzw. RNA-Konzentration

Zur Überprüfung der Qualität und Quantifizierung von DNA bzw. RNA wurde eine spektrophotometrische Messung durchgeführt. Hierzu wurde die DNA bzw. RNA mit DNase bzw. RNase-freiem H₂O 1:20 verdünnt und die Extinktion bei $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 280$ nm gemessen. Der Quotient der Messung bei $\lambda = 260$ nm und bei $\lambda = 280$ nm diente als Maß für die Reinheit der RNA. Der Quotient sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen, kleinere Werte sprechen für eine Verunreinigung mit Proteinen. Für die Konzentrationsberechnung gilt:

E 260 = 1 entspricht bei dsDNA 50 µg/ml

E 260 = 1 entspricht bei ss DNA oder RNA 40 µg/ml

E 260 = 1 entspricht bei Oligonukleotiden 20 µg/ml

2.6.1.11 Polymerasekettenreaktion - PCR

Die PCR ist eine Methode zur exponentiellen Amplifikation von Nukleinsäuren. Hierbei wurde der Ansatz wie in Tabelle 1 gezeigt pipettiert und in einem Thermocycler (GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, Foster City, CA) mit dem jeweils angegebenen Temperaturprofil durchgeführt.

Tabelle 1
PCR-Standardpipettieransatz

H ₂ O	14.5 µl
Taq-Polymerase-Puffer (10 x)	2.0 µl
dNTP-Mix (10 mM)	0.5 µl
cDNA-Matrize (1 µg)	1.0 µl
Forward Primer (50 µM)	0.5 µl
Reverse Primer (50 µM)	0.5 µl
Taq-Polymerase (2,5 U/µl)	1.0 µl
Total	20.0 µl

Für die Amplifikation spezifischer neuronaler Neurofascin-Sequenzen wurde folgendes Primerpaar eingesetzt:

NF27F (5' -CACATTGCCCCCGACTACCGTG-3')

NF30R (3' -CAGGATCAGCACCAGAAGGGC-5')

Als interne Kontrolle diente die Amplifikation des Enzyms Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Die Primersequenzen lauten wie folgt:

GAPDH_f (5' -GGCATTGCTCTCAATGACAA-3')

GAPDH_R (3' -TGTGAGGGAGATGCTCAGTG-5')

2.6.1.12 Real-Time quantitative PCR

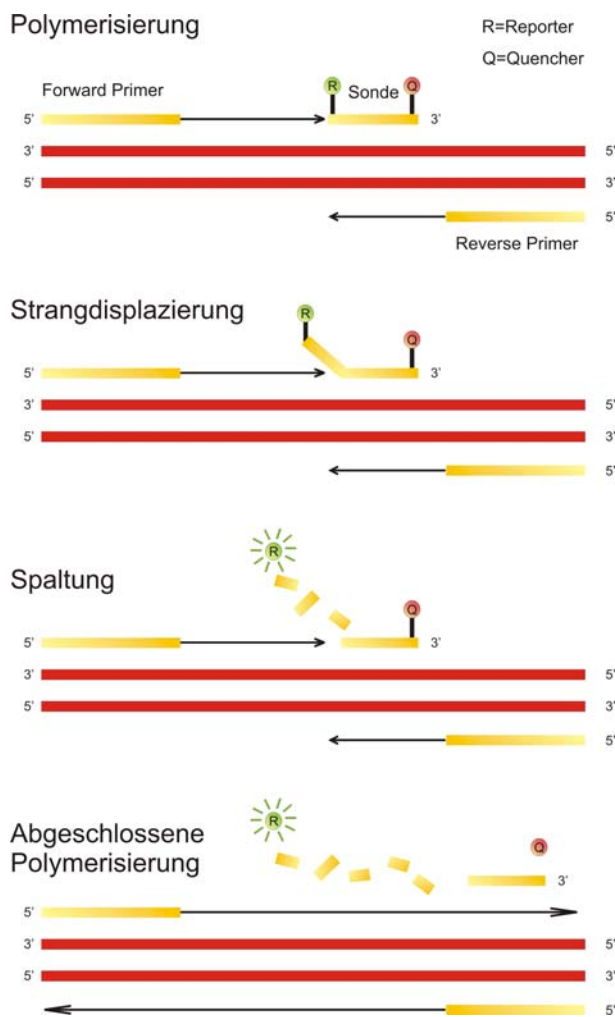


Abbildung 4 - Schema der TaqMan®-RT-PCR.

Die *Real-Time* quantitative PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR zur Amplifikation von Nukleinsäuren, bietet jedoch zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung des amplifizierten Produktes. Diese wird durch Ausnutzung des sogenannten Fluoreszenz (Förster)-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) ermöglicht. FRET basiert auf der Eigenschaft eines durch eine Lichtquelle angeregten Donor-Fluorochroms (Reporter) einen Teil seiner Energie an ein in ausreichender Nähe befindliches Akzeptor-Fluorochrom bzw. einen Quencher zu transferieren. Nimmt der Abstand zwischen Akzeptor und Donor zu, so nimmt FRET und somit das Fluoreszenzsignal des Akzeptors ab, während das des Donors zunimmt. Bei der sogenannten TaqMan®-*Real Time*-PCR werden sogenannte TaqMan®-Sonden eingesetzt, die am einen Ende einen Quencher und am anderen Ende einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Tamra und FAM) tragen.

Baut die Taq-Polymerase, welche zusätzlich Exonuklease-Aktivität besitzt, die Sonde während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende

ab, entfernen sich dadurch Quencher und Fluorophor voneinander und eine steigende Reporter-Fluoreszenz kann gemessen werden. Um einen relativen Mengen-Vergleich des amplifizierten Produktes durchführen zu können, wurde als Referenzgen das Haushaltsgen GAPDH in die Messung mit einbezogen.

Für die *Real-Time* PCR stand das ABI PRISM 7000 System (Applied Biosystems, Foster City, CA) zur Verfügung. Das Temperaturprofil entsprach den Standardeinstellungen des Gerätes und ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2

TaqMan® - Temperaturprofil

50 °C	2 min (1x)
95 °C	10 min (1x)
95 °C	15 sec (40x)
60 °C	1 min (40x)

Es wurde ein Mastermix angefertigt, von dem jeweils 23.75 µl in die speziell für den TaqMan®-Cycler konzipierten 96-Well-Platten vorgelegt wurde. Dazu wurden je 1.25 µl (100 ng) cDNA (siehe 2.6.1.9) bzw. H₂O für die Wasserkontrolle pipettiert. Die PCR Reaktion wurde im *TaqMan*® OneStep RT-PCR MasterMix durchgeführt und setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 3

TaqMan® -Pipettierschema

H ₂ O	7.50 µl
Forward Primer (18 µM; Rn00588180_m1)	1.25 µl
Reverse Primer (18 µM; Rn99999916_s1)	1.25 µl
Sonde (4 µM)	1.25 µl
Universal PCR Master mix (Applied Biosystems)	12.50 µl
Total	23.75 µl

Quantifizierung

Der Beginn der exponentiellen Produkt-Zunahme, der linearen Logphase der PCR, wird aufgrund der Fluoreszenzzunahme bestimmt und entspricht dem sogenannten Crossing Point bzw. CT-Wert (Threshold Cycle). Dieser korreliert mit der Anfangskonzentration der zu amplifizierenden cDNA-Sequenz und kann deshalb zur Quantifizierung der Transkripte herangezogen werden. Die relative Quantifizierung wurde mit Hilfe der „delta-delta-CT“-Methode durchgeführt. Hierbei wird der CT-Wert des Haushaltsgens GAPDH vom zugehörigen CT-

Wert des Zielgenes subtrahiert (Normalisierung). Anschließend werden die delta-CT-Werte der einzelnen Gruppen (Kontrolle/Behandlung) voneinander abgezogen und in die Gleichung $n\text{-fache Expression Gruppe A zu B} = 2^{-\text{delta-delta-CT}}$ eingesetzt.

2.6.1.13 Inhibierung der Genexpression mittels shRNA

Unter RNA-Interferenz (RNAi) versteht man die sequenzspezifische, posttranskriptionelle Inhibierung der Genexpression durch den gezielten Einsatz von 19-21 bp langen einzelsträngigen RNA-Molekülen (siRNA) bzw. doppelsträngigen haarnadelförmigen RNA-Molekülen (shRNA), welche zur Sequenz des auszuschaltenden Gens homolog sind.

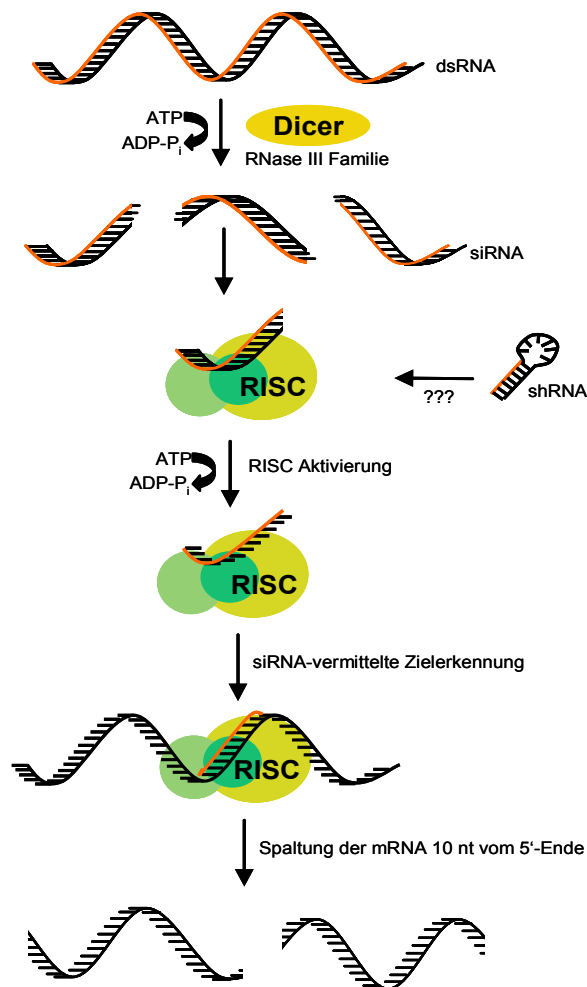


Abbildung 5 – Schema der si/shRNA-vermittelten RNA-Interferenz.

Unter RNA-Interferenz (RNAi) versteht man die sequenzspezifische, posttranskriptionelle Inhibierung der Genexpression durch den gezielten Einsatz von 19-21 bp langen einzelsträngigen RNA-Molekülen (siRNA) bzw. doppelsträngigen haarnadelförmigen RNA-Molekülen (shRNA), welche zur Sequenz des auszuschaltenden Gens homolog sind. In der Zelle wird doppelsträngige RNA (dsRNA) von der RNase III Dicer in ca. 20 bp große Fragmente (siRNA) gespalten. Diese werden vom sogenannten RNA-induced-silencing complex (RISC) gebunden. In ihm wird der sense Strang der siRNA entfernt, wodurch RISC aktiviert wird. RISC bindet dann an diejenige zelleigene mRNA, deren Sequenz komplementär zur im RISC gebundenen siRNA ist. Hierbei werden sogenannte doppelsträngige siRNAs induziert, welche zu einer mRNA-Degradation und somit zu einer spezifischen Suppression der Zielgen-Expression führen. Im Gegensatz zu siRNA sind bei der vektorbasierenden shRNA komplementäre Regionen durch einen Sequenzabschnitt von 4-6 bp Länge getrennt,

den sogenannten „Loop“. Dieser veranlasst das Transkript zur Rückfaltung, wodurch die Haarnadelform zustande kommt. shRNA wird wie siRNA in einen aktivierten RISC-Komplex eingebaut und führt zum Abbau der Ziel-mRNA.

Design von Neurofascin-spezifischen shRNA-Sequenzen

Die Generierung Neurofascin-spezifischer shRNAs erfolgte unter Nutzung von siRNA-Design Software. Mit Hilfe dieser wurden, basierend auf der cDNA-Sequenz des Zielgenes Neuro-

fascin (Gene Bank Accession no. NM_053909), spezifische siRNA-Sequenzen von 19 bp Länge ermittelt. Die zugrunde liegenden Algorithmen der einzelnen Programme zur Auswahl geeigneter siRNAs können im Internet erfragt werden (<https://www.genscript.com/ssl-bin/app/rnai>; <http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/home.php>; <http://www.dharmacon.com/DesignCenter/DesignCenterPage.aspx>; bzw.). Unter den ermittelten siRNA-Sequenzen wurden drei aufgrund ihres „Score“-Wertes ausgewählt, welcher ein algorithmischer Indikator für die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Inhibition mit dieser Sequenz darstellt. Zusätzlich wurden die siRNA-Sequenzen mit Hilfe der Suchfunktion „BLAST“ analysiert, um signifikante Homologien mit anderen Genen als dem Zielgen Neurofascin ausschließen zu können. Nachfolgend wurden diese dann als Vorlage für die Synthese der folgenden doppelsträngigen shRNA-Oligomere herangezogen:

sh_NF1504:

5`-ACACTCCGATGGTTTAAAGAC**CGAA**TCTTAAACCATCGGAGTGT-3`
 5`-ACACTCCGATGGTTTAAAGAT**TTCG**TCTTAAACCATCGGAGTGT-3`

sh_NF252:

5`-GATTGAATGTGAAGCTAAAC**CGAA**TTTAGCTTCACATTCAATC-3`
 5`-GATTGAATGTGAAGCTAAAT**TTCG**TTTAGCTTCACATTCAATC-3`

sh_NF1383:

5`-TGCCTTCGTCAGCGTATTAC**CGAA**TAATACGCTGACGAAGGCA-3`
 5`-TGCCTTCGTCAGCGTATTAT**TTCG**TAATACGCTGACGAAGGCA-3`

Die Synthese der shRNA-Oligomere erfolgte durch die Firma Operon Biotechnologies GmbH (Köln). Die lyophilisierten shRNAs wurden durch Lösen in RNase-freiem H₂O auf eine Endkonzentration von 200 µmol eingestellt. Die anschließende Ligation in das pENTR_U6-Plasmid erfolgte gemäß dem Protokoll des Block-iTTM U6 RNAi Entry Vector Kit (Invitrogen, Karlsruhe). Dieses wurde speziell für die Expression von shRNA in Säugerzellen unter der Kontrolle des humanen U6 Promotor entwickelt. Die Transfektion von shRNA-Vektoren in Zellen erfolgte mit Lipofectamine 2000TM (siehe 2.6.2.3). In Abhängigkeit von der Abundanz des Zielproteins und dessen Halbwertszeit war bei funktioneller shRNA ein „*knockdown*“-Phänotyp nach 3-6 Tagen detektierbar.

2.6.2 Zellkultur

2.6.2.1 Beschichtung von Deckgläsern

Zu Beginn wurden 50 g Paraffinpellets (Merck, Darmstadt, Erstarrungspunkt 56-58 °C) auf einer Heizplatte unter der Sterilbank bei 70 °C verflüssigt. Währenddessen wurden jeweils

sechs sterile und hydrophile Deckgläschen (Primeglass, Forstinning, 15 mm Durchmesser) mit Hilfe einer Pinzette in eine 6 cm-Zellkulturschale transferiert und so angeordnet, dass sie sich gegenseitig nicht berührten. Unter Verwendung einer gestopften Pasteurpipette wurden pro Deckglas jeweils drei Tropfen des geschmolzenen Paraffins in Form eines Dreieckes an den Deckglasrändern plaziert. Die Wachströpfchen dienten als Abstandshalter (Spacer), um einen direkten Kontakt der später darauf auswachsenden Neuronen mit der Gliazellschicht in Kokultur zu vermeiden. Jedes Deckgläschen wurde mit 100 µl frischer und steriler Poly-L-Lysin-(PLL)-Lösung beschichtet und über Nacht im Brutschrank bei 37° C, 5% CO₂ und 95 % rel. Luftfeuchte inkubiert. Am nächsten Tag wurde die PLL-Lösung abgesaugt und mit 5 ml sterilem H₂O für 5 min gewaschen. Dieser Vorgang wurde wiederholt, das sterile H₂O wurde jedoch erst nach 2 h abgezogen. Die 6 cm-Zellkulturschale wurde anschließend mit zwei weiteren Deckgläschen bestückt und auf insgesamt acht ergänzt, um die Glasoberfläche zu maximieren und die Plastikoberfläche entsprechend zu minimieren. Die Zellkulturschale wurde mit 5 ml DMEM-HS befüllt und im Brutschrank bei 37° C, 5% CO₂ und 95 % rel. Luftfeuchte für mindestens 24 h, jedoch maximal vierzehn Tage inkubiert.

2.6.2.2 Präparation und Kultivierung primärer hippokampaler Neurone aus der Ratte

Der Hippokampus gehört als Teil des Archicortex zu den bestuntersuchten Regionen des Gehirns. Durch seine begrenzten Neuronentypen und deren bekannte Vernetzung eignet er sich besonders als Modellsystem für die Zellkultivierung. Die Neuronenpopulation in dissoziierten hippokampalen Zellkulturen ist relativ homogen. Der Anteil von hippokampalen Pyramidenzellen aus dem Ammonshorn wird auf 85-90 % geschätzt (Goslin & Banker, 1998). Die Zellkultur enthält daneben auch einige wenige Körnerzellen aus dem Gyrus dentatus sowie Interneurone. Die Präparation primärer Rattenneurone aus dem Hippokampus im Embryonalstadium 17 (E17) orientierte sich weitgehend am Originalprotokoll von Goslin & Banker (1998). Aufgrund der Verwendung von sogenannten „Low-Density“-Kulturen, d.h. Kulturen geringer Zelldichte, mussten die auf PLL-beschichteten Deckgläschen kultivierten hippokampalen Neurone mit Gliazellen kokultiviert werden. Für die Präparation von Gliazellen wurden die zerebralen Hemisphären benötigt, welche grundsätzlich bei der Präparation der Hippokampi gewonnen wurden. Für die Neurogliale-Kokultur wurden 1 DIV (Day(s) In Vitro = Tag(e) *in vitro*) befindliche Neurone zu Zellkulturschalen mit vierzehn Tage kultivierten Gliazellen transferiert. Vor Beginn der Präparation wurde das DMEM-HS in den mit Deckgläsern bestückten 6cm-Zellkulturschalen durch 5 ml NMEM-B27-Medium ersetzt und für mindestens 1 h im Brutschrank bei 37° C, 5 % CO₂ und 95 % rel. Luftfeuchte equilibriert. HBSS wurde im Wasserbad (37° C) vorgewärmt. Für die Präparation primärer hippokampaler Neurone wurde eine (zeitlich verpaarte) trächtige Ratte (Sprague Dawley, E17) mit CO₂-Gas betäubt und

durch Dekapitation getötet. Die Embryonen wurden mit Hilfe des Set #1 aus dem Uterus entnommen und dekapitiert. Mit Hilfe des Set #2 wurde der embryonale Schädel geöffnet, das Gehirn freigelegt und in eine Pertrischale mit vorgewärmtem HBSS transferiert. Für die Präparation der Hippokampi wurde unter dem Binokular zunächst der Hirnstamm abgetrennt, bevor die Großhirnhemisphären ausgehend vom Bulbus olfactoris mit Hilfe von Set #3 von den Meningen befreit wurden. Die Isolation des Hippokampus einer jeden Hemisphäre erfolgte durch einen präzisen konvexen Schnitt entlang der Hemisphären-Außen-seite. Anschließend wurden die Hippokampi und Hemisphären jeweils in separate Falcon-Röhrchen mit 15 ml vorgewärmten HBSS überführt. Die Hemisphären wurden für die Gewinnung von Gliazellen benötigt. Dabei waren insgesamt zwei Hemisphären ausreichend.

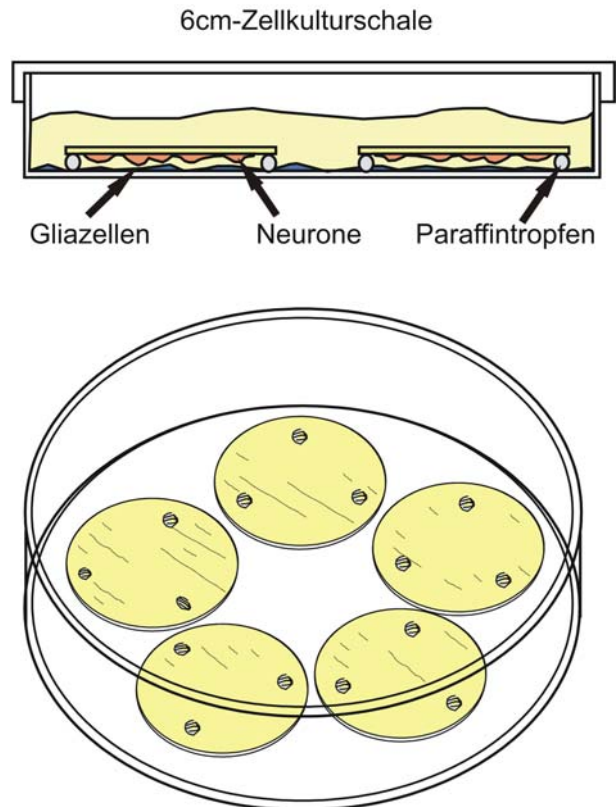


Abbildung 6 – Neurogliale Kokultur. Hippokampale Neurone und Gliazellen befinden sich in Nährmedium auf zwei unabhängigen Kultursubstraten. Diese sind mit Hilfe von Abstandshaltern aus Paraffin voneinander getrennt. Diese Konstruktion erlaubt einen Austausch von löslichen, überlebensfördernden Substanzen, verhindert aber eine starke Kontamination der neuronalen Kultur durch Gliazellen.

Für die Trypsinierung der Hippokampi wurde das HBSS durch 5 ml Trypsin-EDTA ersetzt und 10 min bei 37° C inkubiert. Danach wurde das Trypsin-EDTA abgesaugt und die Hippokampi insgesamt drei Mal mit frischem HBSS gewaschen. Anschließend wurden diese in einem Volumen von 1.5 ml HBSS mit einer feuerpolierten Pasteurpipette 20-25 Mal auf- und abgezogen. Dann wurde das Gewebe eine weitere Minute mit einer Pasteurpipette trituriert, deren Spitzenöffnung auf den halben Umfang reduziert war. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Es wurden insgesamt 1×10^5 -Zellen auf acht PLL-beschichtete Deckgläser ausgesät, die sich in einer 6 cm-Zellkulturschale befanden. Dabei ergab sich eine Dichte von 36 Zellen / mm^2 . Der Tag des Ausplattierens der aus dem Gewebe dissoziierten Neuronen wird als 0 DIV bezeichnet. Nach der Aussaat der hippokampalen Neuronen erfolgte die Trypsinierung der Großhirn-Hemisphären. Nach zwanzigminütiger Inkubation bei 37° C wurden die 5 ml Trypsin-EDTA durch 5 ml DMEM-HS ersetzt und das Gewebe mit Hilfe einer 5 ml Pipette 1 min lang trituriert. Die Zellsuspension wurde in eine T75-Zellkulturflasche mit 20 ml DMEM-HS überführt. Nach 24 h wurden die Gliazellen mit

vorgewärmtem PBS gewaschen und durch frisches DMEM-HS ersetzt. Der Waschvorgang wurde nach drei Tagen wiederholt. Nach sieben Tagen wurden die Gliazellen in einem Verhältnis von 1:3 gesplittet und in neue Zellkulturflaschen überführt. Für die Verwendung in der Neuronen-Glia-Kokultur wurden am elften Tag jeweils 20.000 Gliazellen pro 6 cm-Schale in 5 ml DMEM-HS ausgesät. Zwei Tage später wurde das DMEM-HS durch 5 ml NMEM-B27 ersetzt und am nächsten Tag wurden die mit 1 DIV Neuronen-besiedelten Deckgläser invertiert in Kokultur mit den Gliazellen gebracht, so dass die Neurone der Gliazellschicht zugewandt lagen. Die Kultivierungsdauer der ausgesäten Zellen wurde dem jeweiligen Zweck des Versuchs angepasst.

2.6.2.3 Transfektion von Zellen

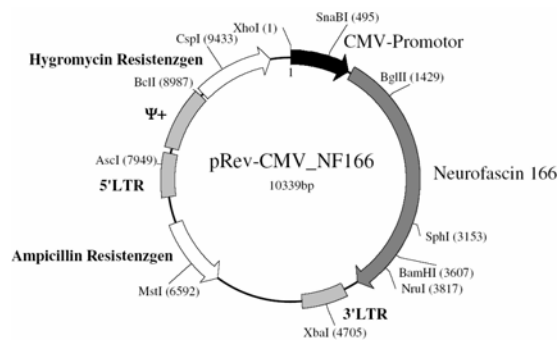
Transiente Lipofektion von HEK293-Zellen mit Effectene® (Qiagen, Hilden)

Bei der Lipofektion wird die DNA mittels einer kationischen Lipidmischung von Liposomen umhüllt, welche mit der Zellmembran fusionieren und so die DNA in die Zelle schleusen können. Das Vorgehen entsprach den vom Hersteller empfohlenen Angaben.

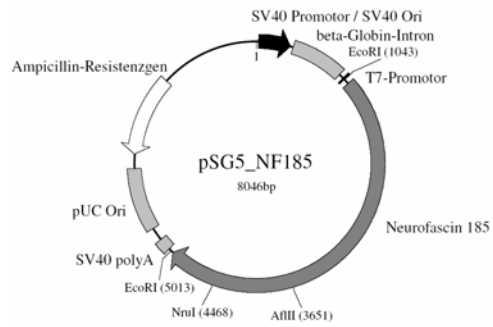
Transiente Transfektion hippocampaler Neurone mit LipofectAMINE 2000™

Zu Beginn wurde eine 12-Well-Zellkulturplatte mit 400 µl NMEM-B27 pro Well befüllt und bei 37° C, 5 % CO₂ und 95 % rel. Luftfeuchte equilibriert. Dann wurde in jedes Well jeweils ein mit 4 DIV Neuronen-besiedeltes Deckglas transferiert. Dabei war darauf zu achten, dass die Paraffintropfen des Deckglases und somit auch die Neurone nach oben zeigten. Pro Deckglas wurden 0.2 µg DNA des Expressionsplasmids sowie 0.1 µg DNA eines GFP-Plasmids eingesetzt. Letzteres diente als Detektionskontrolle transfizierter Zellen. Die gesamte DNA wurde in 50 µl NMEM-B27 aufgenommen und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. In einem separaten Ansatz wurden pro Deckglas 1.5 µl LipofectAMINE 2000™ in 50 µl NMEM-B27 aufgenommen. Nach fünfminütiger Inkubation wurden beide Ansätze vermengt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurden in jedes Well 100 µl des Transfektionsmixes tropfenweise zugegeben und die Zellkulturplatte vorsichtig geschwenkt. Nach zweistündiger Inkubation bei 37° C, 5 % CO₂ und 95 % rel. Luftfeuchte wurden die Deckgläschen durch mehrmaliges Eintauchen in frisches, equilibriertes und vorgewärmtes NMEM-B27 gewaschen. Anschließend wurden sie zurück in Kokultur gebracht und sechs Tage lang kultiviert. Nach dieser Zeit wurden sie für immunzytochemische Zwecke herangezogen

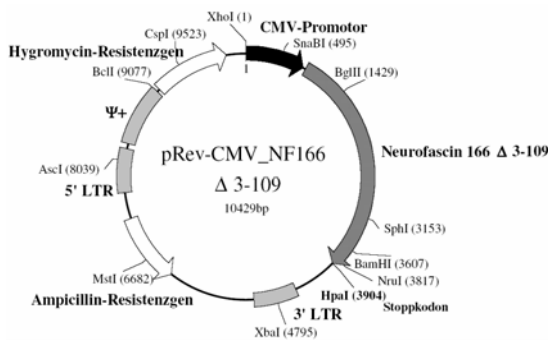
2.6.3 Plasmidkarten



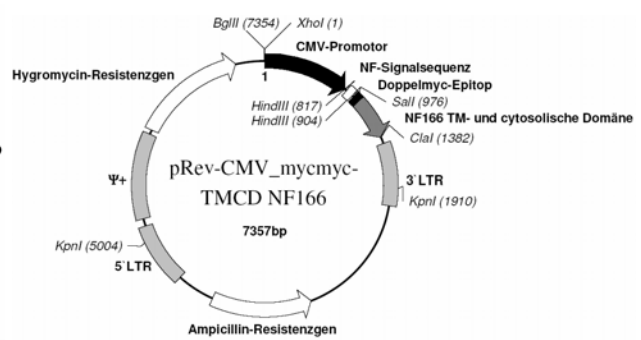
pRev-CMV_NF166



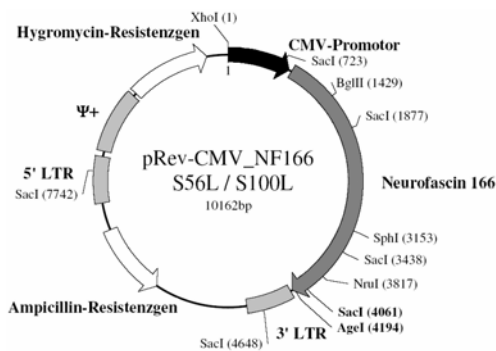
pSG_NF185



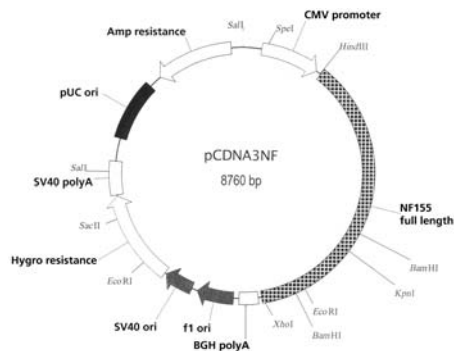
pRev-CMV_NF166-ED



pRev-CMV_NF166-CD



pRev-CMV_NF166 S56L / S100L
(repräsentativ für NF166 S56A / S100A)



pCDNA3_NF155

2.6.4 Immunzytochemie

2.6.4.1 Antikörperliste

Tabelle 4

Bezeichnung	Antigen	Wirtsspezies	Arbeitskonzentration	Hersteller
anti-AnkyrinG	AnkyrinG	Maus	2 µg/ml	Calbiochem, Darmstadt, D
anti-GABA _A Rezeptor, β-UE	GABA _A -Rezeptor, β2/3-Untereinheit	Maus	5 µg/ml	Chemicon, Temecula, CA, USA
anti-GAD6	Glutamat-decarboxylase	Maus	1: 400 (Hybridoma-überstand)	Developmental Studies, Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa City IA, USA
anti-GAD65	Glutamat-decarboxylase	Kaninchen	1.7 µg/ml	Chemicon, Hampshire, UK
anti-Gephyrin	Gephyrin	Maus	1.7 µg/ml	BD Biosciences, Pharmingen, D
anti-L1	L1	Maus	5 µg/ml	Acris Antibodies, Hiddenhausen, D
anti-MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (a+b)	Maus	12 µg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
anti-MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (a+b)	Kaninchen	0.1 µg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
anti-NCAM	NCAM (<i>R. norvegicus</i>)	Ziege	5 µg/ml	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA
anti-NF	Neurofascin (<i>G. gallus</i>)	Maus	10µg/ml	laboreigen
anti-NF	Neurofascin (<i>R. norvegicus</i>)	Kaninchen	1:1000	von P. Brophy zur Verfügung gestellt
anti-PSD-95	Postsynaptische Dichte-95	Maus	5 µg/ml	Affinity Bioreagents, Hamburg, D
anti-SMI31	Neurofilament H	Maus	1:3000 (Ascites)	Sternberger Monoclonals Inc., Maryland, USA
anti-VGlut 1	Vesikul. Glutamat transporter 1	Maus	1 µg/ml	Synaptic Systems, Göttingen, D

2.6.4.2 Immunfärbung von primären Neuronen

Für die Detektion von Proteinen mittels spezifischer Antikörper wurden die hippocampalen Neurone zunächst fixiert. Dazu wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit Fixierlösung überschichtet. Nach 15 min bei Raumtemperatur wurde die Fixierlösung vorsichtig abgesaugt und die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen. Nach fünfminütiger Inkubation in Permeabilisierungslösung und einem 30-minütigen Blockierschritt mit Blockierungslösung (1 x) erfolgte die Zugabe des Erstantikörpers, der ebenfalls in Blockierungslösung verdünnt wurde. Die eingesetzten Antikörperkonzentrationen sind aus der Liste aus 2.6.4.1 ersichtlich. Die Inkubation des Erstantikörpers erfolgte über Nacht bei 4 °C. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS-gewaschen und mit dem Zweitantikörper inkubiert. Die eingesetzte Konzentration der Zweitantikörper lag bei 7.5 µg/ml in Blockierungslösung. Bei Einsatz von monoklonalen Erstantikörpern wurde ein Cy3™- bzw. Cy2™- (Indocarbocyanin) gekoppelter mausspezifischer Zweitantikörper aus Ziege (Dianova, Hamburg), zur Detektion polyklonaler Erstantikörper ein Cy3™- bzw. Cy2™-gekoppelter kaninchenspezifischer Zweitantikörper aus Ziege (Dianova, Hamburg 111-165-003) eingesetzt. Die Bindungszeit des Zweitantikörpers betrug 1 h bei Raumtemperatur. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für die mikroskopische Auswertung in Fluoreszenz-Mountingmedium (DakoCytomation GmbH, Hamburg) eingedeckt.

2.6.4.3 Kolokalisationsanalyse

HEK293- bzw. PC12E2-Zellen wurden transient mit GFP-Gephyrin- und NF166-Expressionsvektoren transfiziert. Um das Clustern von Neurofascin zu induzieren, wurden die Zellen mit einem spezifischen monoklonalen Huhn-Neurofascin-Antikörper in Kulturmedium 30 min lang bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in PBS gewaschen. Zur Visualisierung der Neurofascincluster wurde ein Cy3™-gekoppelter mausspezifischer Zweitantikörper aus Ziege eingesetzt (Dianova, Hamburg). Nach einstündiger Inkubationszeit bei 37° C wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und 10 min lang in Fixierlösung inkubiert. Das Eindecken der Zellen erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mountingmediums (DakoCytomation GmbH, Hamburg)

2.6.5 Statistik

Statistische Analysen wurden mit Microsoft Excel (*t*-test) und Statview 5.0 (ANOVA, SAS-Institute Inc.) durchgeführt. Die Gültigkeit der Nullhypothese zur Häufigkeitsverteilung nominalskalierter Daten wurde mit dem Chi-Quadrat-Test untersucht. Bei normalverteilten Gesamtheiten wurde die Varianzanalyse (ANOVA) herangezogen. Alle Experimente wurden

mindestens drei Mal wiederholt. p-Werte < 0,001 wurden als hochgradig signifikant betrachtet.

2.6.6 Mikroskopische Auswertung und Bildanalyse

Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem Axiovert 200M Mikroskop und einer AxioCAM MRm Kamera (Carl Zeiss MicroImaging, Inc., Göttingen) erhalten. Konfokale Aufnahmen wurden mit einem CLSM 510 Meta (Carl Zeiss MicroImaging, Inc.) unter Verwendung eines 63 × Plan-Apochromat Ölimmersionsobjektives generiert. Die eingesetzten Exzitations-Laserwellenlängen lagen bei 488 nm (Cy2), 544 nm (Cy3), 633 nm (Cy5). Die Cy2-Emission wurde mit einem Bandpass-Filter bei 505 nm – 530 nm) detektiert. Diejenige für Cy3 bzw. Cy5 wurde mit dem META Detektionskanal-Set bei 563 – 585 nm bzw. 633 – 670 nm erfasst. Die Analyse der mikroskopischen Aufnahmen erfolgte mit der Software ImageJ 1.34s (NIH, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Für die Quantifizierung synaptischer Cluster wurde das Plugin „Draw Roi“ verwendet. Die mikroskopischen Einstellungen wurden für alle Experimente konstant gehalten. Fluoreszenzaufnahmen wurden nur hinsichtlich ihres Kontrastes bzw. ihrer Helligkeit angepasst.

Für die Quantifizierung der Neurofascin- bzw. L1-Expression wurden die mittleren Fluoreszenzintensitäten von shRNA-transfizierten und anti-Neurofascin bzw. anti-L1 gefärbten AIS zum Entwicklungszeitpunkt 10 DIV ermittelt. Die Werte wurden entsprechend durch Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz normalisiert.

3 ERGEBNISSE

3.1 Immunzytologische Charakterisierung dissoziierter Neurone aus dem Hippokampus

3.1.1 Etablierung neuronaler Polarität *in vitro*

Eine grundlegende Eigenschaft neuronaler Zellen ist ihre polarisierte Morphologie, welche durch ein einzelnes längeres Axon und mehrere kürzere Dendriten gekennzeichnet ist. Diese Zellpolarität bildet die Basis für eine schnelle und gerichtete Signalweiterleitung in einem neuronalen Netzwerk (Mattson, 1999). Des Weiteren wird durch diese Polarität die Grundlage für eine spezifische subzelluläre Lokalisation entstehender synaptischer Komponenten geschaffen und ist somit essentiell für den Aufbau eines funktionsfähigen neuronalen Netzwerkes. Für die Untersuchung von Prozessen der inhibitorischen Synaptogenese wurden dissoziierte hippocampale Neurone geringer Dichte als *in vitro*-Modellsystem verwendet. Zunächst galt es zu überprüfen, ob diese *in vitro* ihre charakteristische neuronale Morphologie ausbilden und damit eine Voraussetzung für die Entstehung von Synapsen *in vitro* erfüllen. Deshalb wurde die Zellpolarität mit Hilfe von Immunzytochemie in dissoziierten hippocampalen Neuronen zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten analysiert.

Als Tag 0 der Kultivierung (0. DIV = Day(s) *In Vitro* = Tag(e) *In Vitro*) wird das Aussäen der

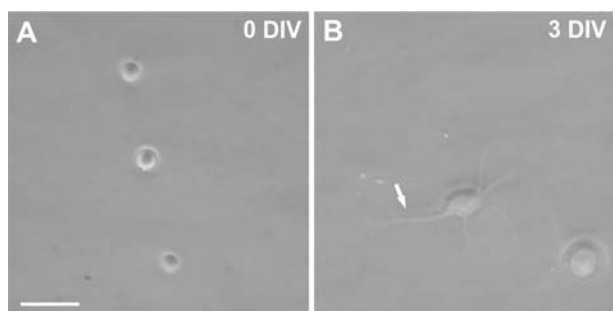


Abbildung 7 - Durchlichtaufnahmen hippocampaler Neurone am Tag der Aussaat und am 3. DIV. (A) Frisch ausgesäte Zellen (0. DIV) wiesen eine runde Morphologie auf. (B) Am 3. DIV war bereits ein deutlich längerer Neurit erkennbar (Pfeil), das Axon. Maßstab: 5µm.

aus dem Gewebe dissoziierten Neuronen bezeichnet. Zu diesem Zeitpunkt besaßen alle Zellen eine runde Morphologie (Abbildung 7 A). Innerhalb der nächsten Tage wuchsen aus dem Zellkörper mehrere Ausläufer aus, die Neuriten (Abbildung 7 B). Einer dieser Neuriten wies ein fortgeschrittenes Längenwachstum auf. Es handelte sich um das Axon (Abbildung 7 B Pfeil). Im Gegensatz dazu blieben die übrigen Neuriten, als dendritische Ausläufer bezeichnet, deutlich kürzer. (Abbildung 7 B). Somit konnten am 3. DIV das Axon und die

Dendriten anhand ihrer Neuritenlänge identifiziert werden. Demnach wiesen dissoziierte hippocampale Neurone bereits drei Tage nach Aussaat eine polarisierte Morphologie auf.

Ab dem 4. DIV wurde die Entstehung subzellulärer Kompartimente in kultivierten hippocampalen Neuronen mit Hilfe von Immunzytochemie untersucht (siehe 2.6.4.2). Für die Darstellung von dendritischen Ausläufern wurde ein Antikörper gegen das Mikrotubuli-assoziierte Protein 2 (MAP2) verwendet. Dieses ist überwiegend somatodendritisch lokalisiert (Caceres et al., 1984). Neurofilamente werden in Axonen in besonders großen Mengen exprimiert und sind für die Zunahme des Axondurchmessers zuständig (Benson et al., 1996). Um axonale Ausläufer identifizieren zu können, wurde ein spezifischer Antikörper gegen Neurofilament eingesetzt. Des Weiteren kam zur Darstellung des Axoninitialsegmentes (AIS) hippocampaler Neurone ein spezifischer Antikörper gegen das Membranprotein Ankyrin_G zum Einsatz. Ankyrin_G ist vor allem am AIS lokalisiert und dort unter anderem für die Akkumulation von Ionenkanälen und Zelladhäsionsmolekülen verantwortlich (Kordeli et al., 1995).

Zu frühen Entwicklungszeitpunkten (4. DIV) erstreckte sich die Expression des Dendritenmarkers MAP2 neben dem Zellkörper auf alle primären Neuriten. Auch der axonale Neurit zeigte ein MAP2-positives Signal (Pfeil, Abbildung 8 A, D). Dieses wurde mit fortschreitender Entwicklung schwächer und war am 11. und 18. DIV ausschließlich im Soma und in den Dendriten zu erkennen. (Abbildung 8 B-C, E-F). Im Gegensatz dazu war die Expression immunreaktiver Neurofilamente bereits am 4. DIV auf den axonalen Ausläufer begrenzt. Ein deutliches Signal war erst in den distalen Bereichen des Axons, ca. 60 µm vom Soma ent-

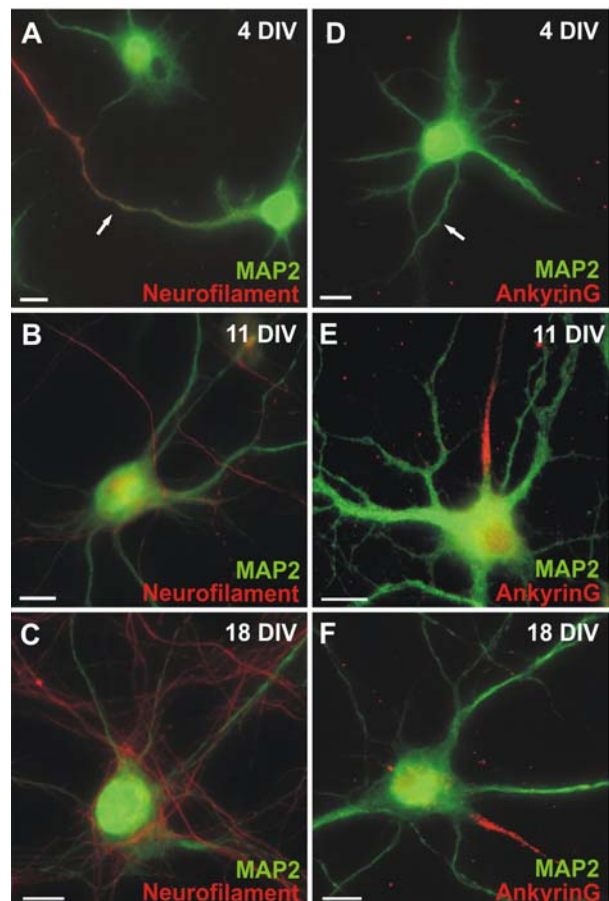


Abbildung 8 – Entstehung neuronaler Polarität während der Entwicklung dissoziierter hippocampaler Neurone. (A, D) Der Dendritenmarker MAP2 wird am 4. DIV in allen primären Neuriten exprimiert. (A–C) Mit zunehmender Entwicklung zieht sich dieser aus dem axonalen Neuriten (Pfeil) zurück, während sich dort Neurofilamente anreichern. Diese veranschaulichen auch die Längenzunahme bzw. den Verzweigungsgrad der Axone zu späteren Entwicklungszeitpunkten. (E, F) Das Axoninitialsegment (AIS) kann mit dem AIS-Marker Ankyrin_G am 11. DIV nachgewiesen werden. Maßstab: 10 µm.

fernt, zu beobachten (Abbildung 8 A). Das AIS war zu diesem Zeitpunkt noch nicht ausgebildet. Dies geht aus der fehlenden Ankyrin_G-Färbung am axonalen Neuriten in Abbildung 8 D (Pfeil) hervor. Ab dem 11. DIV war das AIS deutlich am Ankyrin_G-positiven Signal zu erkennen (Abbildung 8 E). Des Weiteren hatte die Anzahl Neurofilament-positiver Neuriten am 11. DIV zugenommen. Am 18. DIV war ein dichtes axonales Netzwerk zu erkennen (Abbildung 8 B, C). Eine Zuordnung der vom Zellkörper ausgehenden dendritischen Kompartimente eines einzelnen Neurons war zwar möglich, die dazugehörigen axonalen Kompartimente waren jedoch nur sehr schlecht bis gar nicht zu erkennen (Abbildung 8 B, C). Mit diesem Experiment konnte nachgewiesen werden, dass die Polarität hippocampaler Neurone *in vitro* ab dem 11. DIV ausgebildet war und eine Trennung der subzellulären Kompartimente beobachtet werden konnte. Axonale und dendritische Kompartimente konnten einerseits anhand morphologischer Kriterien unterschieden werden, andererseits durch die molekularen Markerproteine MAP2, Neurofilament und Ankyrin_G. Dies ist vergleichbar mit der strukturellen Organisation hippocampaler Neuronen *in situ* (Dotti *et al.*, 1988).

3.1.2 Expression von IgCAMs

Um den Beitrag des IgCAMs Neurofascin bei der inhibitorischen Synaptogenese untersuchen zu können, war es notwendig, dessen Lokalisation *in vitro* zu analysieren. Des Weiteren wurde mit Hilfe der strukturellen Marker aus Kapitel 3.1.1 die Lokalisation der IgCAM-Mitglieder L1 und NCAM in dissoziierten hippocampalen Neuronen zu frühen Entwicklungszeitpunkten immunzytochemisch untersucht.

3.1.2.1 Neurofascin

Um Hinweise für eine mögliche Funktion des CAMs Neurofascin bei Prozessen der inhibitorischen Synaptogenese zu erhalten, wurde zunächst immunzytochemisch dessen Lokalisation in Pyramidenzellen des Rattenhippocampus untersucht. *In vivo* konnte eine Neurofascin-

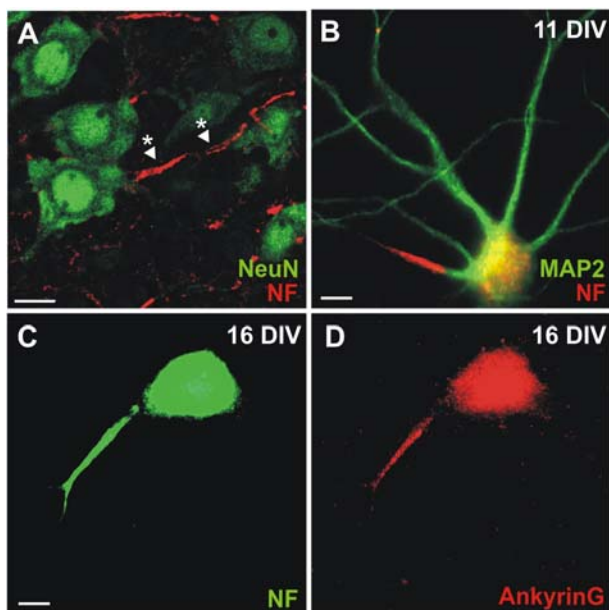


Abbildung 9 – Expression von Neurofascin in hippocampalen Neuronen der Ratte. (A) Konfokale Laserscan-Aufnahme der CA3-Region des Hippocampus. NeuN-positive Neurone exprimieren Neurofascin (NF) am AIS (Pfeilköpfe). (B) Neurofascin ist bei 11 DIV kultivierten hippocampalen Neuronen am distalen AIS und Soma lokalisiert. Dendriten (MAP2) sind davon ausgeschlossen (C, D). Kollokalisierung von Neurofascin und AnkyrinG am AIS derselben Zelle an 16 DIV. Maßstab: 10 µm.

spezifische Immunfärbung in NeuN-positiven Pyramidenzellen der CA3-Region des Hippocampus beobachtet werden (Abbildung 9 A). NeuN ist ein Neuronenspezifisches Markerprotein, welches in adulten Neuronen nukleär exprimiert wird (Mullen et al., 1992). Die Lokalisation der Neurofascin-Expression konzentrierte sich dabei auf das AIS, während die Zellsomata eine schwächere Immunfärbung zeigten (Pfeilköpfe). Am 11. DIV war die Expression von Neurofascin und dem axonalen Gerüstprotein Ankyrin_G in dissoziierten hippocampalen Neuronen auf den axonalen Neuriten begrenzt und konnte klar von den MAP2-positiven Dendriten unterschieden werden (Abbildung 9 B). Ebenso zeigten die Zellkörper eine intensive Neurofascin-Färbung, genau wie dies bei Purkinje-Zellen *in vivo* beschrieben wurde (Di Cristo et al., 2004). Des Weiteren konnte die

Lokalisation von Neurofascin am AIS durch Kofärbung mit dem AIS-Marker Ankyrin_G bestätigt werden (Abbildung 9 C, D). Mit diesem Experiment konnte nachgewiesen werden,

dass Neurofascin auf dem AIS und Soma hippocampaler Neurone exprimiert wird. Ferner werden die *in vivo* beobachteten Expressionsmuster *in vitro* beibehalten.

3.1.2.2 NCAM und L1

Neben Neurofascin wurde für die weitere Charakterisierung hippocampaler Neurone *in vitro* auch die Lokalisation der verwandten IgCAMs NCAM und L1 untersucht. Immunzytochemisch wurden beide CAMs zu frühen Zeitpunkten (9. DIV und 11. DIV) nachgewiesen. Dabei war am 9. DIV das NCAM-Signal homogen über das Soma und die Dendriten hippocampaler Neurone verteilt (Abbildung 10 A). Des Weiteren zeigten NCAM und der Dendritenmarker MAP2 zu diesem Zeitpunkt ein kongruentes Fluoreszenzbild (Abbildung 10 B, C). *In vivo* ist eine zusätzliche Expression von NCAM auf axonalen Ausläufern beschrieben (Charles *et al.*, 2000). Anhand der vorliegenden Abbildung kann jedoch keine Aussage über eine axonale NCAM-Lokalisation getroffen werden. Im Gegensatz zu NCAM zeigte L1 lediglich entlang des Somas und eines Neuriten Immunreaktivität. Es wird angenommen, dass es sich dabei um das Axon handelt, da sich das L1-Signal auf nur einen Ausläufer beschränkte (Abbildung 10 D). Dies entspricht der neuronalen L1-Lokalisation *in vivo* (Scotland *et al.*, 1998). Folglich repräsentierten die drei untersuchten IgCAMs Neurofascin, L1 und NCAM *in vitro* die subzelluläre Lokalisation *in vivo*.

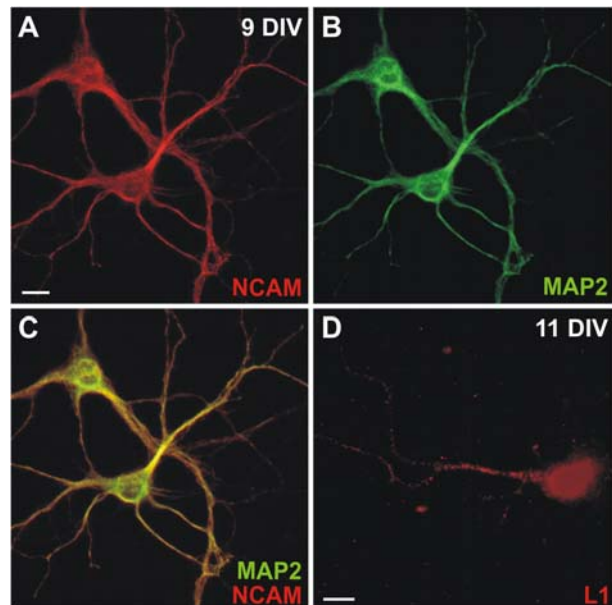


Abbildung 10 – Lokalisation der IgCAM-Mitglieder NCAM und L1. (A-C) NCAM ist am 9. DIV homogen über die gesamte Zelle verteilt wie der Dendritenmarker MAP2. (D) L1 ist am 11. DIV auf dem Axon und dem Soma lokalisiert. Maßstab: 10 µm.

3.1.3 Expression synaptischer Proteine

In Kapitel 3.1.2.1 wurde gezeigt, dass Neurofascin vorwiegend auf dem AIS und dem Soma dissoziierter hippocampaler Neurone lokalisiert. Aufgrund der Tatsache, dass die AIS hippocampaler Pyramidenzellen *in vivo* ausschließlich von inhibitorischen Interneuronen innerviert werden, besteht die Vermutung, dass Neurofascin bei der inhibitorischen Synaptogenese beteiligt ist (Inda *et al.*, 2007). Um dies untersuchen zu können, wurde zunächst der zeitliche

Verlauf der Synapsenbildung in dissoziierten hippocampalen Neuronen immunzytochemisch charakterisiert. Für die Darstellung synaptischer Komponenten wurden prä- und postsynaptische Marker exzitatorischer und inhibitorischer synaptischer Proteine herangezogen. Parallel dazu wurde eine Immunfärbung mit Neurofascin durchgeführt, um eine Aussage über die Lokalisation der synaptischen Komponenten auf dem AIS treffen zu können. Gleichzeitig war auf diesem Kompartiment die Entstehung inhibitorischer Synapsen zu erwarten. Die Analyse der Synaptogenese in dissoziierten hippocampalen Neuronen erfolgte zu einem frühen (10./11. DIV) und einem späten (25. DIV) Zeitpunkt der Synapsenbildung.

3.1.3.1 Expression prä- und postsynaptischer Proteine zu frühen Entwicklungszeitpunkten

Zur Darstellung inhibitorischer Präsynapsen kam ein Antikörper zum Einsatz, welcher das Enzym Glutamatdecarboxylase (GAD65) erkennt. Dieses ist für die Synthese des inhibitorischen Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure (GABA) verantwortlich und vorwiegend in inhibitorischen präsynaptischen Terminalen GABAerger Interneurone angereichert (Benson et al., 1994; Mangan et al., 2005). Für den spezifischen Nachweis exzitatorischer präsynaptischer Terminale wurde ein Antikörper eingesetzt, welcher gegen ein vesikuläres Transportprotein des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat (VGlut) gerichtet ist (Wojcik et al., 2004). Exzitatorische postsynaptische Komponenten wurden mit Hilfe eines Antikörpers gegen das in der postsynaptischen Dichte (PSD) exzitatorischer Synapsen angereicherte Protein PSD-95 identifiziert (Rao et al., 1998; Colledge et al., 2003). Inhibitorische postsynaptische Strukturen wurden mit einem Antikörper gegen das Gerüstprotein Gephyrin nachgewiesen, welches selektiv im postsynaptischen Komplex inhibitorischer Synapsen akkumuliert ist (Craig et al., 1996).

Die Experimente in Kapitel 3.1.1 zeigen, dass dissoziierte hippocampale Neurone zu frühen Entwicklungszeitpunkten (11. DIV) bereits eine ausgeprägte Polarität besaßen. Des Weiteren war das CAM Neurofascin selektiv am AIS und Soma, einschließlich des Axonhügels, lokalisiert (Abbildung 9 B). Die Analyse inhibitorischer präsynaptischer Terminale ergab, dass am 10. DIV GABAerge Terminale am Soma und AIS hippocampaler Pyramidenzellen existierten (Abbildung 11 I). Neben inhibitorischem präsynaptischen Input fanden sich dort auch exzitatorische Terminale (Abbildung 11 C). Diese stammen größtenteils von glutamatergen Pyramidenzellen, welche den Hauptanteil der hippocampalen Neuronenkultur ausmachen. Demnach existierten am 10. DIV sowohl exzitatorische als auch inhibitorische präsynaptische Komponenten auf den hippocampalen Zellkörpern und dem AIS. Im Gegensatz zum Soma fehlten am AIS jedoch die zugehörigen exzitatorischen postsynaptischen

ERGEBNISSE

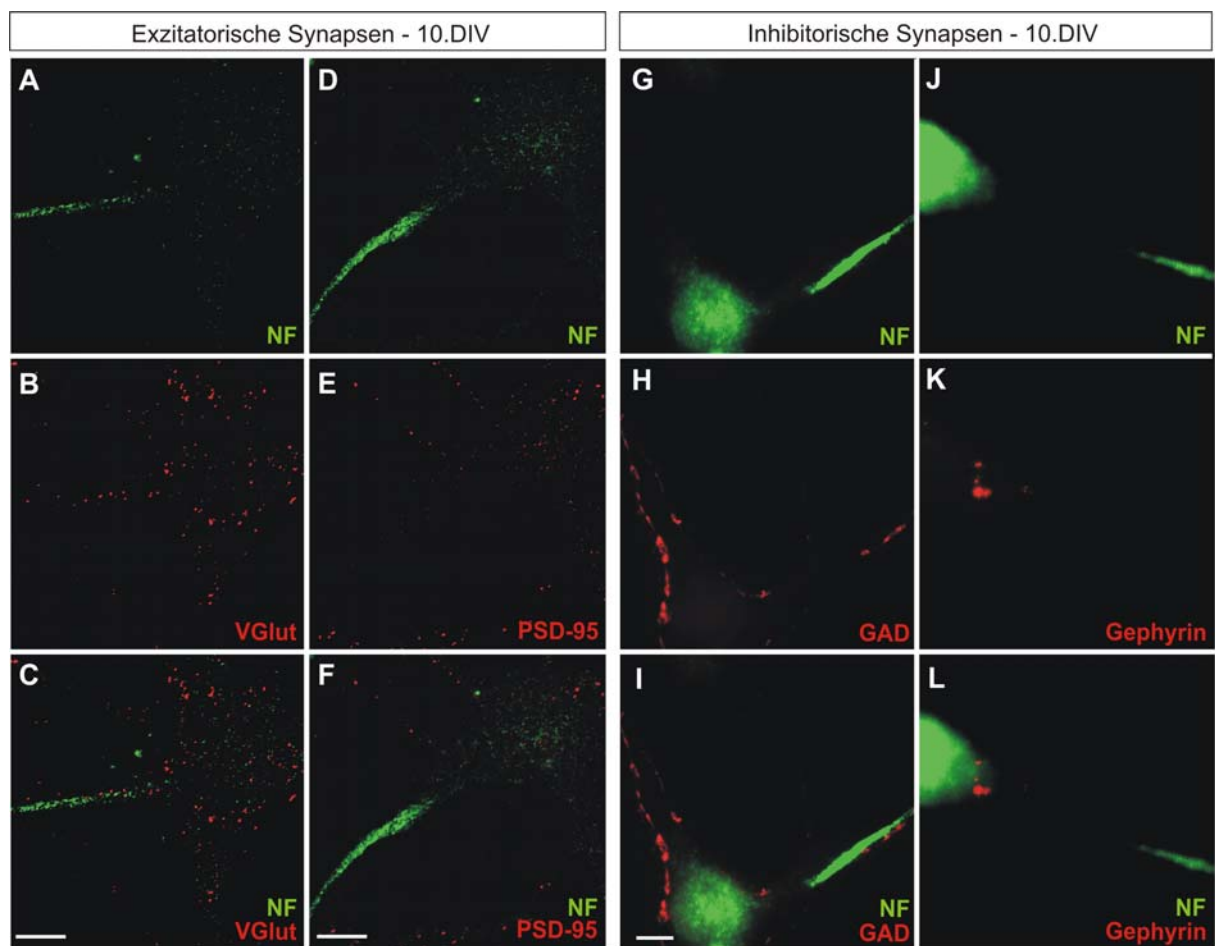


Abbildung 11 – Lokalisation exzitatorischer und inhibitorischer synaptischer Strukturen in unreifen hippocampalen Neuronen. (A, D, G, J) Neurofascin (NF) – gefärbte AIS 10 DIV kultivierter hippocampaler Neurone. (B, E) Exzitatorische Präsynapsen bzw. Postsynapsen wurden mit Antikörpern gegen VGLut bzw. PSD-95 detektiert. (H, K) Inhibitorische Prä- und Postsynapsen wurden mit Antikörpern gegen GAD und Gephyrin detektiert. (C, F) Mischbilder aus A-B bzw. D-E. (I, L) Mischbilder aus G-H bzw. J-K. (A-F) Konfokale Laserscan-Aufnahmen. (G-L) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. Maßstab: 10 µm.

Komponenten. Dies deutet auf unvollständige glutamaterge Synapsen am AIS bzw. auf eine Fehllokalisierung des glutamatergen Inputs hin (Abbildung 11 F), da sich auf dem AIS hippocampaler Pyramidenzellen *in vivo* keine exzitatorischen Synapsen befinden. Ebenfalls existierten zu diesem Zeitpunkt auf dem AIS keine inhibitorischen postsynaptischen Strukturen. Diese waren ausschließlich am Neurofascin-positiven Axonhügel des Somas hippocampaler Neurone vorzufinden (Abbildung 11 L).

Zusammenfassend kann die Aussage getroffen werden, dass am 10. DIV sowohl die exzitatorische als auch die inhibitorische Synaptogenese noch nicht vollständig abgeschlossen waren. Die Bildung exzitatorischer prä- und postsynaptischer Komponenten war insgesamt weiter fortgeschritten als die der inhibitorischen Synapsen. So existierten am 10. DIV bereits glutamaterge Terminale sowie exzitatorische Postsynapsen auf dem Soma und den Dendriten (Tabelle 5). Somit könnten am 10. DIV bereits korrekt gepaarte exzitatorische Prä-

und Postsynapsen existieren. Am AIS war die Lokalisation kompatibler inhibitorischer prä- und postsynaptischer Komponenten jedoch unvollständig. So fehlten auf diesem Kompartiment postsynaptische Gephyrincluster, während GABAerge Terminale bereits existierten (Tabelle 5).

Tabelle 5 – Lokalisation exzitatorischer bzw. inhibitorischer Synapsen auf subzellulären Kompartimenten am 10. DIV.

		Subzelluläres Kompartiment		
		Soma	AIS	Dendrit
präsynaptisch	exzitatorisch (Vglut)	+	+	+
	inhibitorisch (GAD65)	+	+	+
postsynaptisch	exzitatorisch (PSD95)	+	-	+
	inhibitorisch (Gephyrin)	+	-	-

(+) vorhanden (-) nicht vorhanden

3.1.3.2 Expression prä- und postsynaptischer Proteine zu späten Entwicklungszeitpunkten

In weiteren Experimenten wurde die Expression prä- und postsynaptischer Proteine zu späten Entwicklungszeitpunkten untersucht. Am 25. DIV konnten am Neurofascin-positiven AIS sowohl GAD65-positive Terminale als auch postsynaptische Gephyrincluster identifiziert werden. Dies deutet auf das Zusammensetzen kompatibler inhibitorischer Komponenten im Laufe der Synapsenreifung und damit auf funktionelle GABAerge Synapsen *in vitro* hin (Abbildung 12 G-L). Die am 10. DIV beobachteten präsynaptischen glutamatergen Terminale (VGlut) am AIS konnten am 25. DIV nicht mehr detektiert werden. Ebenfalls waren dort wie am 10. DIV keine PSD-95-positiven Signale zu finden (Abbildung 12 A-F). Hingegen beschränkte sich die Lokalisation glutamaterger Terminale und exzitatorischer Postsynapsen nun auf die somatodendritischen Kompartimente (Abbildung 12 A-F). Des Weiteren war die Neurofascin-Expression am Soma abgeschwächt zugunsten eines deutlicheren Signals am distalen AIS (Abbildung 12 A, D, G, H). Dieses reflektierte das Erscheinungsbild reifer Neurone, wie in hippocampalen Schnitten gezeigt werden konnte (Abbildung 9 A). Gephyrin-positive Cluster wurden am 25. DIV neben dem AIS auch auf dem Soma und den Dendriten hippocampaler Neurone beobachtet.

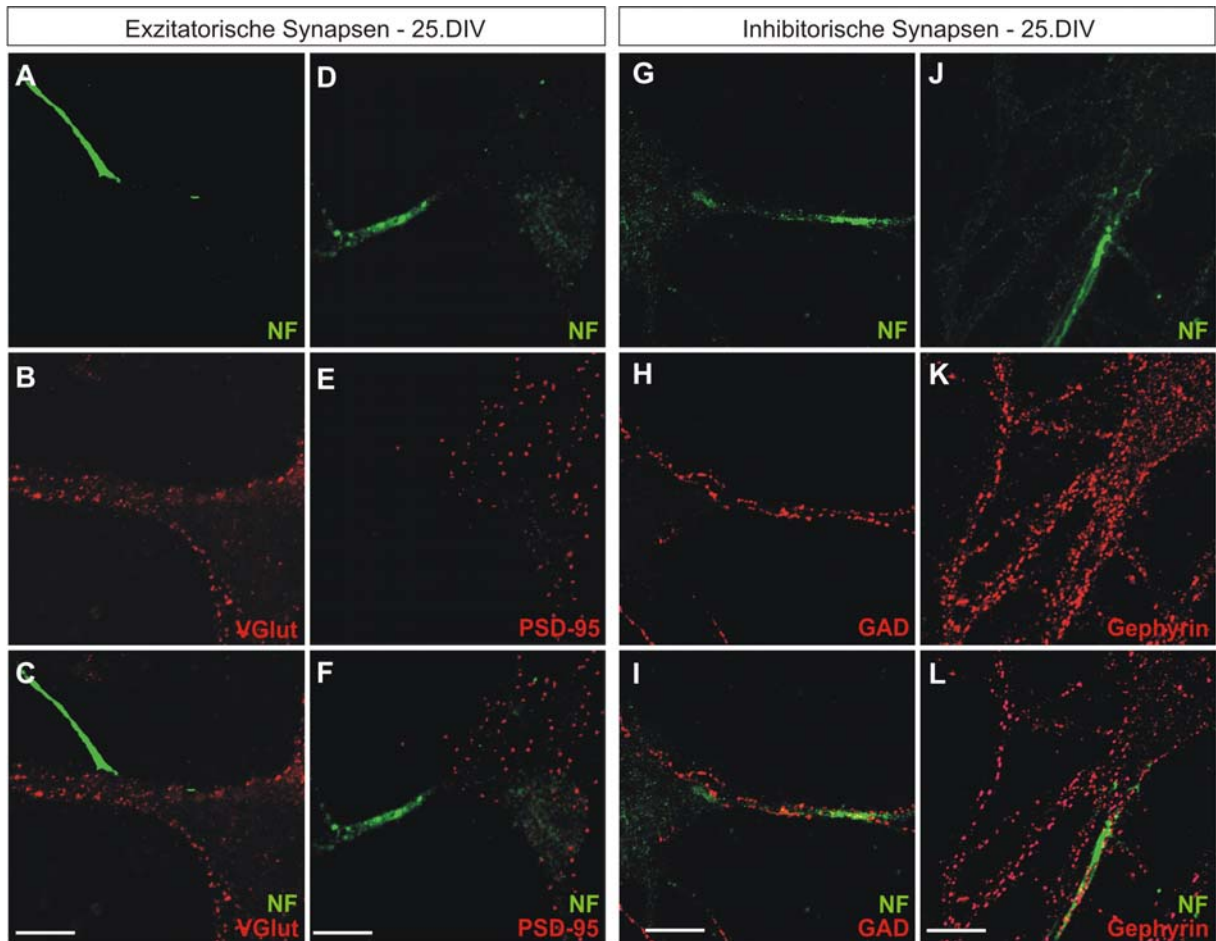


Abbildung 12 - Lokalisation exzitatorischer und inhibitorischer Synapsen in reifen hippocampalen Neuronen. (A, D, G, J) Konfokale Laserscan-Aufnahmen Neurofascin (NF)-gefärbter AIS 25. DIV kultivierter hippocampaler Neurone. (B, E) Exzitatorische Präsynapsen bzw. Postsynapsen wurden mit Antikörpern gegen VGlut bzw. PSD-95 detektiert. (H, K) Inhibitorische Prä- und Postsynapsen wurden mit Antikörpern gegen GAD und Gephyrin detektiert. (C, F) Mischbilder aus A-B bzw. D-E. (I, L) Mischbilder aus G-H bzw. J-K. Maßstab: 10 μ m.

Diese Ergebnisse weisen auf eine kontrollierte dynamische Regulation der Synapsenbildung *in vitro* hin. Zwischen dem 10. DIV und 25. DIV scheinen Stabilisierungs- und Eliminationsprozesse stattgefunden zu haben. So wurden fehllokalisierte exzitatorische Terminale am AIS eliminiert. Gleichzeitig wurden dort kompatible inhibitorische synaptische Kontakte stabilisiert. Folglich kann der Schluß gezogen werden, dass die Synapsenbildung nach 25 DIV abgeschlossen ist und reife, potentiell funktionsfähige Synapsen in Kultur vorliegen. Exzitatorische und inhibitorische präsynaptische Terminale lokalisierten zu diesem Zeitpunkt auf spezifischen subzellulären Kompartimenten des postsynaptischen Neurons. So wurden auf dem Zellkörper exzitatorische und inhibitorische Synapsen identifiziert. Im Gegensatz dazu befanden sich auf dem AIS ausschließlich inhibitorische Synapsen. Des Weiteren war der Großteil dendritischer Synapsen exzitatorischen Charakters. Dies entspricht dem Verteilungsmuster synaptischer Komponenten *in vivo* (Lardi-Studler & Fritschy, 2007).

3.1.3.3 Expression von GABA_A-Rezeptoren

Die Clusterbildung von GABA_A-Rezeptoren und Gephyrin ist im Verlauf der inhibitorischen Synptogenese funktionell miteinander gekoppelt (Sassoe-Pognetto *et al.*, 1995; Craig *et al.*,

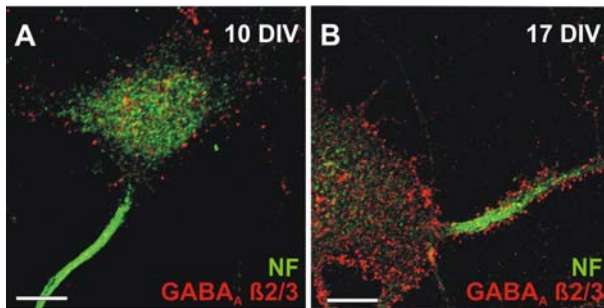


Abbildung 13 - Lokalisation von GABA_A-Rezeptoren in hippocampalen Neuronen. (A) Kofärbung 10 DIV kultivierter hippocampaler Neurone mit Neurofascin (NF) und einem monoklonalen Antikörper gegen die β 2/3-Untereinheit von GABA_A-Rezeptoren (B) Kofärbung am 17. DIV. Die Zahl somatischer GABA_A-Rezeptorcluster hatte zugenommen und es wurden zusätzliche Cluster auf dem AIS identifiziert. Maßstab: 10 µm.

1996; Jacob *et al.*, 2005). Deshalb wurde die Verteilung von GABA_A-Rezeptor β 2/3-Untereinheiten in hippocampalen Neuronen näher untersucht. Mit Hilfe von Immunzytochemie konnten am 10. DIV in Clustern vorliegende GABA_A-Rezeptor β 2/3-Untereinheiten auf dem Soma beobachtet werden (Abbildung 13). Am 17. DIV waren diese klar und deutlich auf dem Soma, dem Neurofascin-positiven AIS und zusätzlich auf den Dendriten vorzufinden. Dies deutet auf eine fortgeschrittene Reifung inhibitorischer Synapsen hin. Die Clusterbildung von Gephyrin und der GABA_A-Rezeptor

β 2/3-Untereinheit auf dem Soma am 10. DIV erfolgte also zeitlich gesehen parallel zueinander. Jedoch streute die Verteilung der GABA_A-Rezeptor β 2/3-Untereinheit mehr als die von Gephyrin, dessen Lokalisation zu diesem Zeitpunkt auf den Axonhügel begrenzt war.

3.2 Expressionsdynamik von Neurofascin und Gephyrin im Verlauf der Entwicklung hippocampaler Neurone *in vitro*

3.2.1 Lokalisation von Neurofascin und Gephyrin im Verlauf der Entwicklung

Dissoziierte hippocampale Neurone zeigen eine räumliche Separation ihrer Synapsentypen. So befindet sich ein Großteil der inhibitorischen Synapsen auf dem Soma und AIS reifer hippocampaler Neurone (Benson & Cohen, 1996). Während auf dem Soma und den Dendriten jedoch auch exzitatorische Synapsen existieren, befinden sich auf dem AIS ausschließlich inhibitorische Synapsen. Die Expression des CAMs Neurofascin auf dem Zellsoma und AIS in sich entwickelnden Neuronen deutet daher auf einen möglichen Beitrag dieses Proteins bei der Entstehung inhibitorischer Synapsen hin.

Im folgenden Experiment wurde deshalb die Lokalisation von Neurofascin und Gephyrin im Verlauf der Entwicklung näher analysiert. Die immunzytochemische Untersuchung 4 DIV kultivierter hippocampaler Neurone zeigte, dass sowohl Neurofascin als auch Gephyrin bereits im neuronalen Zellsoma exprimiert wurden (Abbildung 14 A). Am 7. DIV wurden die ersten Gephyrincluster im Soma und am Axonhügel sichtbar, wohingegen auf dem AIS keine Cluster zu finden waren (Abbildung 14 B, B'). Zum gleichen Zeitpunkt war Neurofascin weiterhin auf dem Soma lokalisiert, mit einer betonten Färbung im Bereich des Nukleus und einer reduzierten Färbung der

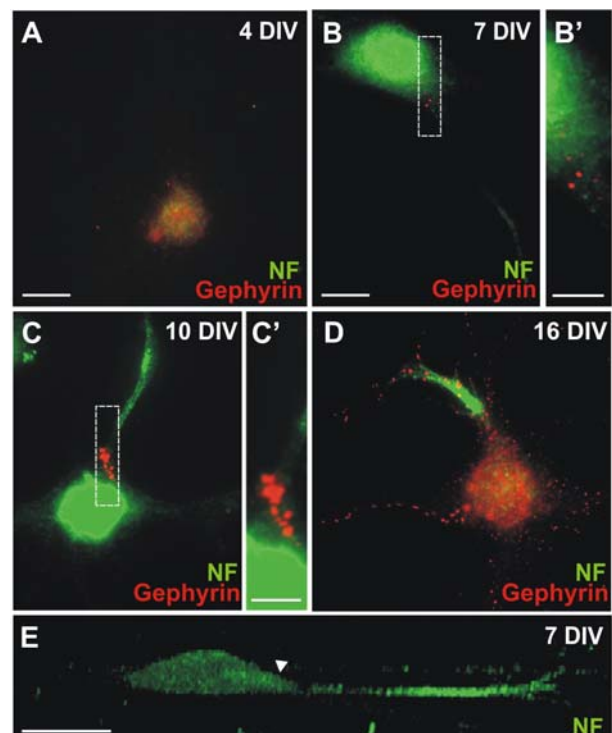


Abbildung 14 - Lokalisation von Neurofascin und Gephyrin in hippocampalen Neuronen während der Entwicklung. (A) Am 4. DIV war eine diffuse Neurofascin- und Gephyrin-Färbung am Soma zu beobachten. (B, C) Zwischen dem 7. DIV und 10. DIV wurden Gephyrincluster am Neurofascin-positiven Axonhügel sichtbar und Neurofascin reicherte sich am AIS an. (D) Am 16. DIV konnten Gephyrin-positiv Cluster schließlich auch auf dem Neurofascin-positiven AIS sowie auf dem Soma und den Dendriten identifiziert werden. (B') bzw. (C') repräsentieren die vergrößerten Ausschnitte der eingerahmten Bereiche in (B) bzw. (C). (E) 3D-Rekonstruktion eines 7 DIV kultivierten hippocampalen Neurons, das mit NF-angefärbt wurde. Maßstab: 10 µm.

perinukleären Bereiche einschließlich des Axonhügels. Überdies konnte ein schwaches Neurofascinsignal auf dem putativen distalen AIS beobachtet werden. Die 3D-Rekonstruktion eines 7. DIV kultivierten Neurons ermöglichte eine Seitenansicht des Axonhügels (Abbildung 14 E). Hierbei war die Neurofascinfärbung des Somas und des Axonhügels deutlich zu erkennen (Abbildung 14 E, Pfeilkopf). Am 10. DIV zeigte neben dem Soma auch das putative Axon eine verstärkte Neurofascinfärbung (Abbildung 14 C, C'). Am Axonhügel war das Neurofascinsignal zwar noch vorhanden, jedoch stark reduziert im Vergleich zu den distalen Teilen des AIS. Die Zahl der Gephyrincluster stieg in diesem Zeitraum an. Am 16. DIV war die Neurofascinexpression auf dem Soma reduziert, wohingegen ein deutliches Signal auf dem AIS zu erkennen war (Abbildung 14 D). Gephyrincluster konnten zu diesem Zeitpunkt sowohl auf dem Soma als auch auf dem Neurofascin-positiven AIS gefunden werden.

Dies deutet darauf hin, dass die Umverteilung von Neurofascin und Gephyrin abgeschlossen war. Zusätzliche Gephyrincluster konnten auch auf den Dendriten beobachtet werden. Dies lässt vermuten, dass die Entstehung inhibitorischer Synapsen an Dendriten Neurofascin-unabhängig erfolgt, da dieses nicht in Dendriten lokalisiert ist. Die parallele Translokation von Neurofascin an das putative AIS bzw. von Gephyrinclustern an den Axonhügel im Verlauf der Entwicklung deutet jedoch auf einen möglichen Zusammenhang zwischen somatischer Neurofascinexpression zu frühen Entwicklungszeitpunkten und der Bildung bzw. Translokation von Gephyrinclustern an den Axonhügel hin.

3.2.2 Expression von Neurofascin während der Entstehung von Gephyrinclustern

Zur Untersuchung eines möglichen Zusammenhanges zwischen der Expression von Neurofascin und der Entstehung von Gephyrinclustern, wurde die Expressionsdynamik von Neurofascin im Verlauf der Entwicklung hippocampaler Neurone näher analysiert. Hierzu wurde die mRNA hippocampaler Neurone unterschiedlicher Entwicklungsstadien zunächst isoliert (Kapitel 2.6.1.7) und anschließend mit Hilfe von quantitativer *Real-Time*-PCR quantifiziert (Kapitel 2.6.1.12). Die quantitative *Real-Time*-PCR gab ein biphasisches Expressionsmuster zu erkennen (Abbildung 15). Hippokampale Neurone *in vitro* begannen bereits ab dem 2. DIV Neurofascin zu exprimieren. Die mRNA-Synthese nahm in den darauf folgenden vier Tagen zu und erreichte am 6. DIV ein erstes relatives Expressionsmaximum. Ab dem 7. DIV nahm die Expression ab bis zu einem relativen Expressionsminimum am 9. DIV, gefolgt von einem zweiten Maximum am 12. DIV. In diesem Zeitraum fand auch die immunzytochemisch beobachtete Translokation von somatischem Neurofascin an das AIS statt (Kapitel

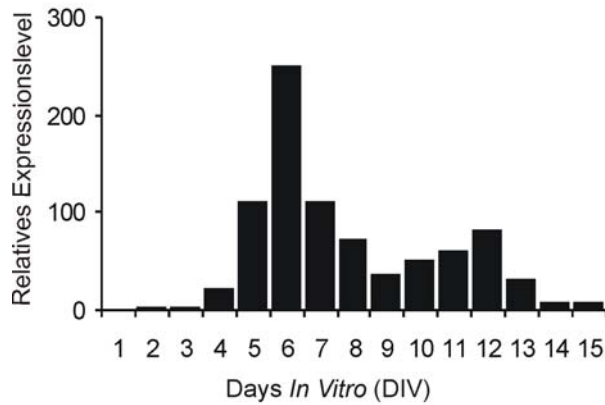


Abbildung 15 – Quantitative *Real-Time* PCR-Analyse der Neurofascin-Expression im Verlauf der Entwicklung dissoziierter hippocampaler Neurone. Das Neurofascin-Expressionsmuster war biphasisch mit zwei relativen Maxima am 6. DIV und 12. DIV.

3.2.1). Zu späteren Zeitpunkten exprimierten dissoziierte hippocampale Neurone eine vergleichsweise geringe Menge an Neurofascin-mRNA. Die stärkste Expression von Neurofascin-mRNA fand somit zwischen dem 5. DIV und 7. DIV statt. Des Weiteren wurden am 7. DIV die ersten Gephyrincluster am Axonhügel identifiziert (Kapitel 3.2.1). Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese eines möglichen Zusammenhanges zwischen der Expression von Neurofascin zu frühen Entwicklungszeitpunkten und der Bildung bzw. Translokation von Gephyrinclustern an den Axonhügel.

3.3 Einfluß der Neurofascin-Isoformen NF166 und NF186 auf frühe Prozesse der inhibitorischen Synaptogenese

Drei Spleißvarianten von Neurofascin sind bisher beschrieben worden. Neben der glialen Isoform NF155 werden zwei neuronale Isoformen NF166 und NF186 exprimiert (Tait *et al.*, 2000; Pruss *et al.*, 2006). NF186 unterscheidet sich dabei von NF166 durch die zusätzliche Expression der extrazellulären fünften Fibronectin-III ähnlichen Domäne (5^{te} FN-III). Diese vermittelt nicht-permissive Eigenschaften hinsichtlich des Neuritenauswachsens und beeinträchtigt die heterophile und homophile Ligandenerkennung (Koticha *et al.*, 2005). Im Huhn (*Gallus gallus*) geht die Expression der für das Neuritenauswachsen fördernden Isoform NF166 derjenigen von NF186 voraus (Pruss *et al.*, 2006). Es ist daher denkbar, dass im Verlauf der ZNS-Entwicklung der Ratte ebenfalls unterschiedliche Neurofascin-Spleißvarianten exprimiert werden. Diese könnten unterschiedliche Funktionen hinsichtlich der inhibitorischen Synaptogenese erfüllen. Bisher wurde davon ausgegangen, dass es sich bei der axonalen Neurofascin-Isoform in der Ratte (*Rattus norvegicus*) um NF186 handelt (Ango *et al.*, 2004; McEwen & Isom, 2004). Eine detaillierte Expressionsanalyse der Isoformen und deren temporäre Regulation während der Entwicklung des Rattengehirns ist bisher aber noch nicht erbracht worden.

3.3.1 Expression von Neurofascin-Isoformen im Hippokampus

Zum Nachweis von Neurofascin-mRNA aus Rattengehirn wurden die für die Exons 27 und 30 spezifischen Oligonukleotide NF27F und NF30R verwendet (Abbildung 16 B). Diese erlauben die Amplifikation von Neurofascin-Varianten, die sich im Vorhandensein der fünften Fibronectin-III ähnlichen Domäne unterscheiden. Die Amplifikation der glialen Neurofascin-Isoform NF155 wird durch den Einsatz des Oligonukleotids NF27F verhindert. Die RT-PCR-Analyse von Gesamt-RNA aus embryonalem (E17), postnatalem (P3) und adultem Gesamthirnlysate ergab zwei prominente PCR-Produkte von 316 bp und 586 bp Länge (Abbildung 16 A). Durch eine Sequenzanalyse des 586 bp-langen PCR-Produktes konnte das Vorhandensein der fünften Fibronectin-III ähnlichen Domäne (NF+5^{te} FN-III) bestätigt werden, was auf die Neurofascin-Isoform NF186 hindeutet (Abbildung 16 B). Im Gegensatz dazu enthielt das 316 bp lange PCR-Fragment lediglich die PAT-Domäne, während die fünfte Fibronectin-III ähnliche Domäne (NF-5^{te} FN-III) fehlte. Dieses Fragment konnte zu allen untersuchten Entwicklungsstadien amplifiziert werden und ist somit bis ins Erwachsenenalter präsent. Die mRNA des NF+5^{te} FN-III-Fragmentes stellte hingegen an E17 und P3 eine unterrepräsentierte Fraktion dar und wurde erst im adulten Gehirn verstärkt exprimiert. Die

Expression von NF+5^{te} FN-III ist demnach ein Charakteristikum reifer Neurone. Dies lässt die Vermutung zu, dass NF186 nicht in frühen Prozessen der Synaptogenese involviert ist. Dafür spielt es möglicherweise zu späteren Zeitpunkten in der Entwicklung eine Rolle, beispielsweise bei der Stabilisierung synaptischer Kontakte.

Die Analyse differenziell exprimierter Neurofascin-Isoformen wurde ebenfalls in kultivierten hippocampalen Neuronen durchgeführt (Abbildung 16 A). Hierzu wurden hippocampale Neurone des Embryonalstadiums 17 (E17) präpariert, dissoziiert und anschließend mehrere Tage weiter kultiviert, bevor die RNA-Extraktion (siehe 2.6.1.7) für die RT-PCR erfolgte. Neurone, die 0 Tage bis 16 Tage (0 DIV-16 DIV) in Kultur gehalten worden waren, exprimierten vorwiegend die Isoform NF-5^{te} FN-III. Im Gegensatz dazu war NF+5^{te} FN-III am 11. DIV und 16. DIV als schwache Bande zu detektieren. Da die Translokation von Gephyrinclustern an den Axonhügel am 10. DIV beobachtet werden konnte (Abbildung 14 C), kann der Schluß gezogen werden, dass zu diesem frühen Entwicklungszeitpunkt NF-5^{te} FN-III die vorherrschend exprimierte Isoform darstellt. Die fast vollständige Abwesenheit von NF+5^{te} FN-III *in vitro* bis zum 16. DIV korreliert mit den *in vivo* Daten. Es konnte folglich eine dynamische Regulation von Neurofascin-Isoformen während der neuronalen Entwicklung gefunden werden. Des Weiteren zeigt dieses Experiment, dass NF186 (NF+5^{te} FN-III) nicht bei frühen Mechanismen der inhibitorischen Synaptogenese im *in vitro* Kultursystem involviert ist.

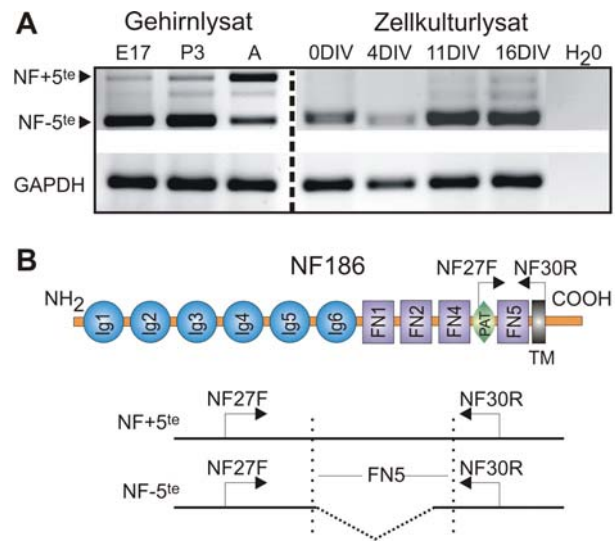


Abbildung 16 - Expression von Neurofascin-Isoformen im Hippokampus. (A) Die RT-PCR Analyse von Gesamthirn- bzw. Zellkulturlysate unterschiedlicher Entwicklungsstadien gab Aufschluss über die Expression bzw. das Fehlen der fünften Fibronectin-Typ III-Domäne (NF±5^{te} FN-III) von Neurofascin. NF-5^{te} FN-III entsprach dem 316 bp PCR-Produkt und wurde zu allen untersuchten Zeitpunkten exprimiert. Das 586 bp PCR-Produkt (NF+5^{te} FN-III) war lediglich im adulten Gehirn prominent. Die Amplifikation von GAPDH diente als Kontrolle. (B) Schema von NF186 mit RT-PCR-Primerbindungsstellen. TM: Transmembrandomäne. Die resultierenden Amplifikationsprodukte sind darunter skizziert. A: Adult, E17: Embryonaltag 17.

3.3.2 Lokalisation heterolog exprimierter Neurofascin-Isoformen in hippocampalen Neuronen

Im vorangehenden Kapitel wurde gezeigt, dass während der Entwicklung des Rattengehirns zwei Neurofascin-Isoformen exprimiert werden, die sich im Vorhandensein der fünften FN-III ähnlichen Domäne unterscheiden. Beide Spleißvarianten könnten somit in Prozessen der inhibitorischen Synaptogenese involviert sein. Eine geeignete Methode zur Untersuchung dieser Fragestellung stellt die Überexpression dar. Hierzu wurden 4 DIV kultivierte hippo-

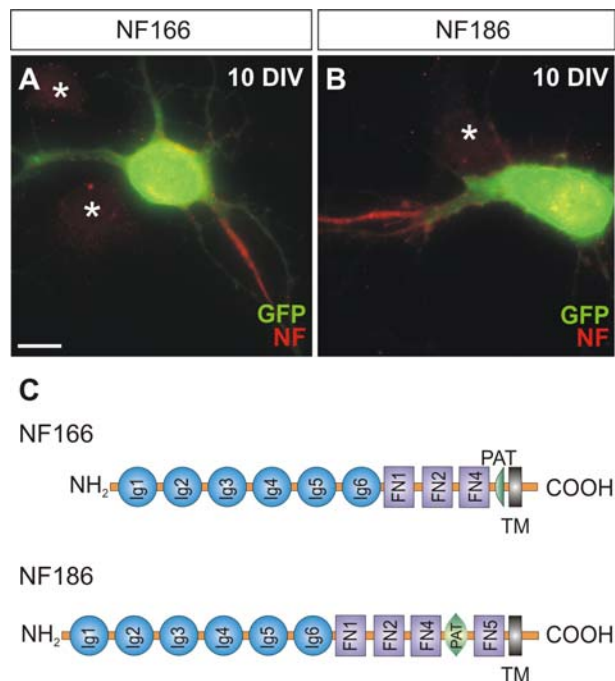


Abbildung 17 – Heterologe Expression embryonaler Huhn-Neurofascin-Isoformen aus *G. gallus* in hippocampalen Neuronen der Ratte. (A, B) Huhn-NF166 und -NF186 werden exprimiert und lokalisieren am Soma und AIS nach Transfektion hippocampaler Neurone. Benachbarte, untransfizierte Zellen (Sternchen) zeigen keine Immunreaktivität mit dem monoklonalen Anti-Huhn-Neurofascin-Antikörper. (C) Schematischer Aufbau der Huhn-Neurofascin-Isoformen NF166 und NF186. NF186 unterscheidet sich von NF166 durch das Vorhandensein der fünften FN-III-Domäne. Maßstab: 10 µm.

kampale Neurone mit Expressionsvektoren der Huhn-Isoformen NF166 bzw. NF186 transfiziert. Ihr Aufbau entspricht den Isoformen NF-5^{te} bzw. NF+5^{te} FN-III (Abbildung 17 C). Zur Detektion transfizierter Neurone, diente ein GFP-Expressionsplasmid, welches kotransfiziert wurde (2.6.2.3). Am 10. DIV wurde zunächst die Expression und Lokalisation der Isoformen mit Hilfe von Immunzytochemie überprüft. Der Nachweis einer korrekten Lokalisation heterolog exprimierter Huhn-Neurofascin Isoformen war notwendig, da erst hierdurch ein Einfluß auf die inhibitorische Synptogenese zu erwarten war. Hierfür kam ein monoklonaler Neurofascin-Antikörper zum Einsatz, der spezifisch Huhn-Neurofascin, jedoch nicht das endogene Ratten-Neurofascin erkennt. Dieser ermöglichte es, exogen exprimiertes Huhn-Neurofascin von endogenem Neurofascin zu unterscheiden. Beide Isoformen waren nach Transfektion am Soma und dem AIS lokalisiert (Abbildung 17 A, B). Dies zeigt, dass die

Lokalisation von heterolog exprimiertem Neurofascin die Expression von endogenem Ratten-Neurofascin rekapituliert. Untransfizierte Neuronen zeigten hingegen eine negative Neurofascin-Immunreaktivität, was auf eine hohe Spezifität des Huhn-Neurofascin Antikörpers schließen lässt (Abbildung 17 A, B; Sternchen).

3.3.3 Einfluß heterolog exprimierter Neurofascin-Isoformen auf die Entstehung von Gephyrinclustern

Aufgrund der korrekten Lokalisation heterolog exprimierter Neurofascin-Isoformen in dissoziierten hippocampalen Neuronen, wurde im folgenden Experiment deren Funktion für die Entstehung von Gephyrinclustern analysiert. Hierzu wurden 4 DIV kultivierte hippocampale Neurone mit den Huhn-Neurofascin Expressionsvektoren transfiziert. NF166 bzw. NF186 sollten hinsichtlich der Ligandenerkennung mit dem endogenen Neurofascin konkurrieren. Um eine mögliche Auswirkung der heterologen Neurofascin-Überexpression auf die Entstehung und Lokalisierung von Gephyrinclustern fest-

stellen zu können, wurden die mit Neurofascin-Isoformen transfizierten hippocampalen Neurone hinsichtlich der Präsenz von Gephyrinclustern auf ihrem Soma analysiert. Zunächst wurde der Anteil transfizierter Neurone bestimmt, die keine Gephyrincluster auf ihrem Soma besaßen. Diesen wurden solche Zellen zugeordnet,

die entweder eine fehlende Gephyrin-Färbung auf dem Soma aufwiesen bzw. solche, deren Soma weniger als drei Gephyrincluster besaßen (Abbildung 18 B). Bei Vorhandensein von Gephyrinclustern wurden die Zellen entsprechend der Lokalisation ihrer somatischen Gephyrincluster unterteilt. So wurden Zellen, die eine korrekte Akkumulation ihrer Gephyrincluster am Axonhügel zeigten (siehe Abbildung 14 C) unterschieden von Zellen, deren Cluster zufällig auf dem Soma verteilt waren. Demnach wurden die transfizierten Neurone bezüglich ihrer Gephyrincluster-Verteilung den folgenden drei Klassen zugeordnet: „fehlend“, „lokalisiert“ und „randomisiert“ (Abbildung 18 C). Kontrollzellen wurden ausschließlich mit einem GFP-Plasmid

unterschieden von Zellen, deren Cluster zufällig auf dem Soma verteilt waren. Demnach wurden die transfizierten Neurone bezüglich ihrer Gephyrincluster-Verteilung den folgenden drei Klassen zugeordnet: „fehlend“, „lokalisiert“ und „randomisiert“ (Abbildung 18 C). Kontrollzellen wurden ausschließlich mit einem GFP-Plasmid

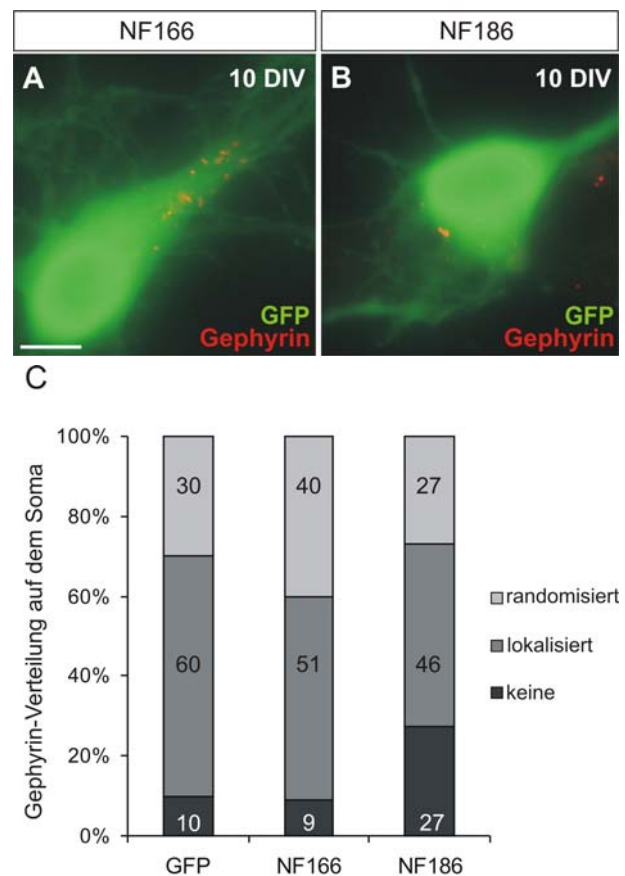


Abbildung 18 - Überexpression von Huhn Neurofascin-Isoformen aus *G. Gallus* in hippocampalen Neuronen. (A,C) Mit NF166 (n=187) transfizierte Zellen zeigten keine veränderte Anzahl und Lokalisation ihrer somatischen Gephyrincluster im Vergleich zu GFP-transfizierten Kontrollzellen (n=124). (B,C) Nach Transfektion von NF186 (n=172) erhöhte sich jedoch der prozentuale Anteil der Zelle ohne Gephyrincluster im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0.0001$, χ^2 -Test). Maßstab: 10 μ m.

transfiziert und repräsentierten die Gephyrincluster-Verteilung untransfizierter Zellen. So fehlten bei 10 % der Kontrollzellen Gephyrincluster, 60 % zeigten eine „lokalisierte“ und 30 % eine randomisierte Verteilung auf dem Soma (Abbildung 18 C). Im Vergleich zur Kontrolle (10 %; n=124) veränderte sich der prozentuale Anteil der Neurone ohne Gephyrincluster nach Transfektion von NF166 nicht (9 %; n=187). Nach Transfektion von NF186 war dieser jedoch signifikant erhöht (27 %; n=172; $p=0,0001$). In Abbildung 18 A und B sind repräsentative Neurone mit bzw. ohne Gephyrincluster nach Transfektion von NF166 bzw. NF186 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass weder die Überexpression der Kontrolle (GFP) noch diejenige der Isoform NF166 (NF-5^{te} FN-III) die Bildung von Gephyrinclustern beeinflusst. Im Gegensatz dazu wird durch Überexpression der Isoform NF186 (NF+5^{te} FN-III) die Gephyrincluster-Entstehung auf den Zellkörpern hippocampaler Neurone verhindert. Dies deutet auf die Notwendigkeit einer zeitlich kontrollierten Isoform-Expression während der Entwicklung hin, um die Etablierung von Gephyrinclustern zu gewährleisten.

3.3.4 Einfluß heterolog exprimierter Neurofascin-Isoformen auf die Entstehung von exzitatorischen postsynaptischen Strukturen

Neurofascin wird spezifisch auf Axonen, jedoch nicht auf Dendriten exprimiert (Abbildung

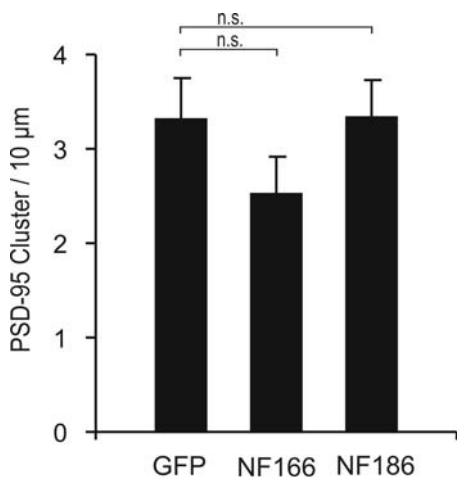


Abbildung 19 - Anzahl der dendritischen PSD-95-Cluster nach Transfektion von Neurofascin-Isoformen. Die Transfektion von NF166 (n=32) und NF186 (n=15) veränderte die Zahl der PSD-95 Cluster auf dendritischen Segmenten nicht signifikant im Vergleich zu GFP-transfizierten Kontrollzellen (GFP: n=42). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

9 B). Folglich ist ein Beitrag von Neurofascin für die Entstehung exzitatorischer Synapsen auf Dendriten unwahrscheinlich. Um dies zu prüfen, wurden 4 DIV kultivierte hippocampale Neurone mit den Isoformen NF166 und NF186 transfiziert. Am 10. DIV wurde die Anzahl dendritischer PSD-95 Cluster bestimmt. Die Zahl PSD-95 positiver Synapsen NF166- bzw. NF186-transfizierter Neurone unterschied sich nicht signifikant von den GFP-transfizierten Kontrollzellen (Abbildung 19). So wurde bei diesen eine Anzahl von 3.3 ± 0.4 PSD-95 Clustern pro dendritischem 10 µm Segment bestimmt. Die Dichte der PSD-95 Cluster nach Transfektion von NF166 lag bei 2.5 ± 0.4 Cluster und diejenige von NF186 bei 3.3 ± 0.4 . Die ANOVA-Analyse ergab keine signifikanten Unterschiede. Demzufolge hatte die heterologe Expression von Neurofascin-Isoformen keinen signifikanten Einfluß auf die Entstehung exzitatorischer Synapsen, sondern aus-

schließlich auf die inhibitorischer Synapsen. Zusammengefasst lieferte dieses Experiment Hinweise für einen spezifischen Effekt von Neurofascin auf die Bildung inhibitorischer Synapsen.

3.4 Einfluß der extrazellulären und zytoplasmatischen Domäne Neurofascins auf die Entstehung von Gephyrin-clustern

Im vorausgegangenen Kapitel wurde gezeigt, dass die Expression der Neurofascin-Isoform NF186 die Gephyrincluster-Bildung verhindert. Da sich NF166 und NF186 lediglich in ihrer extrazellulären Domäne unterscheiden, könnte dies auf die Beeinträchtigung extrazellulärer Interaktionen durch NF186 zurückzuführen zu sein. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass NF186 das Längenwachstum von Neuriten inhibiert (Pruss et al., 2006). Eine damit verbundene schlechtere Zugänglichkeit NF186-exprimierender Neurone zu präsynaptischen Terminalen könnte für die beobachtete reduzierte Zahl an Gephyrincluster beherbergender Zellen nach Überexpression von NF186 verantwortlich sein. Um diese Möglichkeit ausschließen zu können und um Aufschluss über die Rolle Neurofascins für die Clusterbildung von Gephyrin zu erhalten, wurden hippocampale Neurone mit zwei Neurofascin-Deletionsmutanten der permissiven Isoform NF166 transfiziert. Die Transfektion der Deletionsmutante NF166-ED, bestehend aus extrazellulärer Domäne und Transmembrandomäne bzw. NF166-CD, bestehend aus Transmembrandomäne und zytoplasmatischer Domäne, erfolgte am 4. DIV (Abbildung 20 A). Die korrekte Expression beider Deletionsmutanten ist bereits in PC12E2-Zellen über eine Western Blot Analyse bestätigt worden (Kranz, 2006). Am 10. DIV wurde nach beschriebener Methode die Entstehung und Lokalisation von Gephyrinclustern analysiert (Kapitel 3.3.3.).

Die Überexpression von NF166-ED sollte extrazelluläre Interaktionen des endogenen Neurofascins mit potentiellen Interaktionspartnern stören, ähnlich der NF186-Überexpression. Analog zu den mit der Isoform-

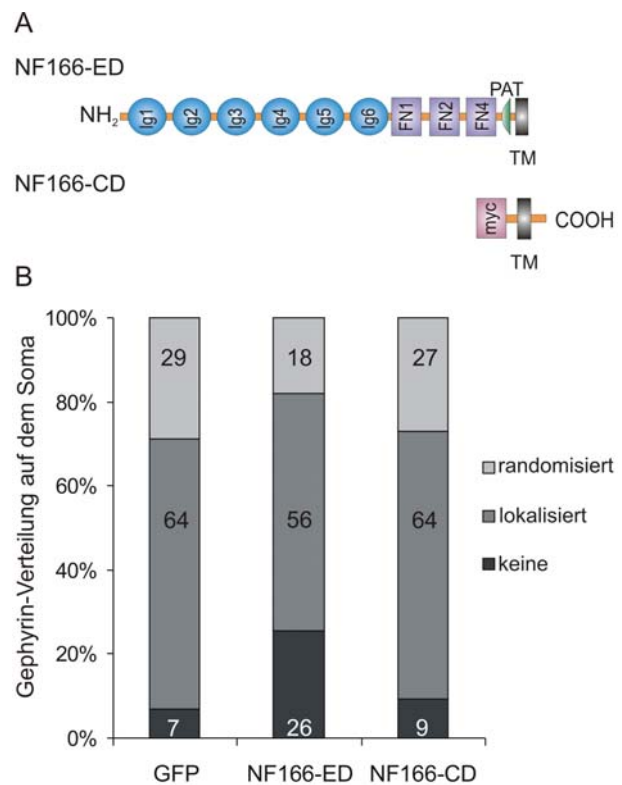


Abbildung 20 – Somatische Gephyrin-Verteilung nach Überexpression von Neurofascin-Deletionsmutanten. (A) Schematische Darstellung der Deletionsmutanten. (B) Nach Überexpression von NF166-ED (n=128) war Anteil der Zellen ohne Gephyrincluster im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen (GFP: n=124; p<0.0003) signifikant erhöht. Im Gegensatz dazu wurde die Clusterbildung von Gephyrin durch Transfektion von NF166-CD (n=149) nicht beeinträchtigt.

expression erhaltenen Ergebnissen unterschied sich die Lokalisation der Gephyrincluster nach Transfektion der Deletionsmutanten nicht signifikant von der Kontrolle. Die Zahl der Neurone ohne Gephyrincluster war jedoch nach Transfektion von NF166-ED signifikant erhöht und belief sich auf einen Anteil von 26 % ($n=149$; $p=0.0003$). Im Vergleich dazu fehlten lediglich bei 7 % der Kontrollzellen somatische Gephyrincluster (GFP; $n=128$) (Abbildung 20 B). Wie im Isoform-Experiment (Kapitel 3.3) gezeigt, scheint auch hier die extrazelluläre Domäne Neurofascins essentiell für die Bildung von Gephyrinclustern zu sein. Die Ergebnisse implizieren überdies, dass die Expression der zytoplasmatischen Domäne zusammen mit der extrazellulären Domäne notwendig für die Entstehung von Gephyrinclustern ist. Folglich ist die durch NF166-ED verursachte Reduktion der Clusterbildung nicht durch repulsive Effekte der fünften Fibronectin III-ähnlichen Domäne von NF186 zu erklären. Deshalb bestätigen die bei der Isoform-Expression erzielten Ergebnisse, dass Neurofascin für die Entstehung von Gephyrinclustern notwendig ist.

Die Überexpression von NF166-CD sollte eigentlich mit intrazellulären Neurofascin-Interaktionspartnern wie z.B. Ankyrin_G in Konkurrenz treten (Ango *et al.*, 2004). Überraschenderweise war die Entstehung von Gephyrinclustern nicht signifikant durch die Überexpression der zytoplasmatischen Domäne beeinträchtigt (9 %; $n=149$). Möglicherweise sind daher Neurofascin-Interaktionen mit Ankyrin_G für die Bildung von Gephyrinclustern unerheblich. Zusammenfassend zeigen die funktionellen Analysen der Deletionsmutante NF166-ED eine Beteiligung der zu frühen Entwicklungszeitpunkten exprimierten Isoform NF-5^{le} FN-III bei der Entstehung von Gephyrinclustern.

3.5 Einfluß von Punktmutationen in der zytoplasmatischen Domäne Neurofascins auf die Entstehung von Gephyrin-clustern

Die extrazelluläre Domäne von CAMs ermöglicht Ligandenbindung mit extrazellulären Interaktionspartnern. Die zytoplasmatische Domäne vermittelt hingegen intrazellulär Signaltransduktion. Das vorangehende Experiment zeigt, dass die extrazelluläre Domäne von NF166 essentiell für die Entstehung von Gephyrinclustern ist. Gleichzeitig liefert dieses Experiment den Hinweis für die Notwendigkeit eines vollständigen Neurofascin-Proteins. Die Überexpression von NF166-CD hatte zwar keinen Einfluß auf die Gephyrincluster-Bildung. Jedoch wurde durch Überexpression der Deletionsmutante NF166-ED, welcher die zytoplasmatische Domäne fehlt, die Anzahl der Zellen mit Gephyrincluster signifikant reduziert. Dies lässt vermuten, dass die zytoplasmatische Domäne von NF166 ebenso notwendig für die Entstehung von Gephyrinclustern ist wie seine extrazelluläre Domäne. Um dies zu überprüfen, wurden Punktmutanten der Neurofascin-Isoform NF166 eingesetzt, die an zwei Aminosäurepositionen des zytosolischen Teils Mutationen aufwiesen.

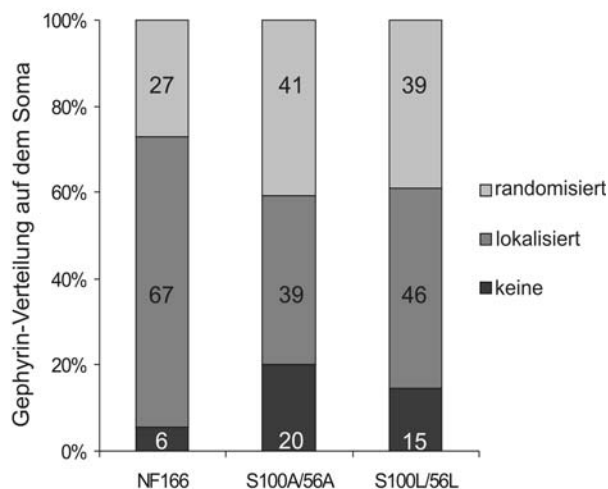


Abbildung 21 – Somatische Gephyrin-Verteilung nach Überexpression von Neurofascin-Punktmutanten. Die Expression der Punktmutanten S100A/56A (n=99) bzw. S100L/56L (n=78) der Isoform NF166 führte zu einem signifikant erhöhten Anteil von Zellen ohne Gephyrincluster (S100L/56L: $p < 0.015$; S100A/56A: $p < 0.0002$) im Vergleich zur Kontrolle (n=94). Ebenso war die Zahl der Zellen mit randomisierten Gephyrinclustern leicht erhöht. Der Chi-Quadrat-Test konnte die Signifikanz dieses Ergebnisses jedoch nur für S100A/56A ($p < 0.008$), aber nicht für S100L/56L bestätigen.

So war die Aminosäure Serin an Position 56 und 100 in der zytosolischen Domäne durch Alanin (S100A/56A) bzw. Leucin (S100L/56L) substituiert. Es konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung dieser Serinreste essentiell für die Neurofascin-vermittelte Neuriteninduktion in PC12E2-Zellen ist, da die oben genannten Punktmutationen das Auswachsen von Neuriten verhinderten und damit funktionell relevant sind (Kranz, 2006). Dissoziierte hippokampale Neurone wurden am 4. DIV mit Expressionsvektoren der Punktmutanten S100A/56A bzw. S100L/56L transfiziert. Am 10. DIV wurde die somatische Gephyrincluster-Verteilung transfizierter Neurone nach bereits beschriebener Methode überprüft (3.3.3). Als Kontrolle diente die permissive Isoform NF166, deren Expression, wie in Kapitel 3.3.3 ge-

zeigt, keine Auswirkungen auf die Bildung von Gephyrinclustern hatte. Die Überexpression der Punktmutanten S100A/56A bzw. S100L/56L der Neurofascin-Isoform NF166 resultierte in einem reduzierten Anteil an Zellen mit somatischen Gephyrinclustern. Im Gegensatz zu den Kontrollzellen (n=94; 6 %) fehlten bei 20 % bzw. 15 % der mit Punktmutanten transfizierten Zellen Gephyrincluster auf dem Soma (S100A/ 56A: n=99; S100L/56L: n=78; Abbildung 21). Mit dem Chi-Quadrat-Test konnte ein signifikanter Unterschied zur Kontrollsituation für beide Punktmutanten (S100A/56A: $p < 0.0002$; S100L/56L: $p < 0.015$) bestätigt werden.

Diese Ergebnisse deuten auf eine Beeinträchtigung der Signaltransduktion durch eine nicht funktionelle zytoplasmatische Domäne und eine damit verbundene gestörte Clusterbildung Gephyrins hin. Die Effekte beider Punktmutanten waren miteinander vergleichbar, was darauf hindeutet, dass der beobachtete Effekt spezifisch auf die Mutation der beiden Serinreste zurückzuführen ist. Neben einer reduzierten Zahl von Zellen mit Gephyrinclustern war nach Transfektion von S100A/56A bzw. S100L/56L auch die Zahl der Zellen mit randomisierten Gephyrinclustern um ca. 10 % erhöht von 27 % bei der Kontrolle auf 41 % bzw. 39 % bei den Punktmutanten. Dieser Effekt war jedoch nur bei S100A/56A ($p < 0,008$) signifikant, während bei S100L/56L ein signifikanter Anstieg von Zellen mit randomisierten Gephyrinclustern nicht bestätigt werden konnte. Die Punktmutanten wurden nach Transfektion in hippocampalen Neuronen exprimiert und lokalisierten wie endogenes Neurofascin am Soma und AIS hippocampaler Neurone (nicht abgebildet). Zusammengefasst kann die Aussage getroffen werden, dass sowohl die extra- als auch die intrazelluläre Domäne von NF166 (NF-5^{te} FN-III) eine wichtige Rolle für die Bildung von Gephyrinclustern spielen. Des Weiteren scheinen die Serinreste an Position 56 und 100 der zytoplasmatischen Domäne Neurofascins eine bedeutende Rolle bei der Clusterbildung Gephyrins zu spielen.

3.6 Einfluß des shRNA-vermittelten Knockdowns von Neurofascin auf frühe Prozesse der Synaptogenese

Um einen weiteren Einblick über die Funktion des CAMs Neurofascin bei Prozessen der inhibitorischen Synaptogenese zu erhalten, wurde der Einfluß eines durch RNAi-vermittelten Neurofascin-Funktionsverlustes auf die Clusterbildung und -lokalisierung von Gephyrin untersucht. Hierzu wurden gegen Neurofascin-mRNA gerichtete shRNA-Vektoren (Kapitel 2.6.1.13) eingesetzt, um die Expression von Neurofascin in dissoziierten hippocampalen Neuronen der Ratte zu inhibieren.

3.6.1 Prävalidierung Neurofascin-spezifischer shRNA-Vektoren in HEK293-Zellen

Mit Hilfe von siRNA-Design Software wurden drei unabhängige Neurofascin-spezifische shRNA-Sequenzen (sh_NF252, sh_NF1504, sh_NF1383) ermittelt, welche unterschiedliche Zielsequenzen innerhalb der Neurofascin-mRNA adressieren. Diese wurden in speziell dafür vorgesehene shRNA-Expressionsvektoren ligiert (Kapitel 2.6.1.13). Als Negativkontrolle diente eine shRNA, deren Sequenz keine Homologie im Rattengenom besitzt (sh_CTR). Die Effizienz der einzelnen shRNA-Sequenzen wurde zunächst in HEK293-Zellen analysiert. Diese eigneten sich im Vergleich zu primären Neuronen durch ihre einfache Handhabung und Transfizierbarkeit. Für die Prävalidierung der Neurofascin-spezifischen shRNAs wurden HEK293-Zellen mit einem shRNA-Plasmid und einem Neurofascin-Expressionsplasmid kotransfiziert, welches die Neurofascin-spezifische Ziel-mRNA lieferte (Kapitel 2.6.2.3). Auf mRNA-Ebene wurde die Suppression der Neurofascin-Expression mittels quantitativer *Real-Time* PCR

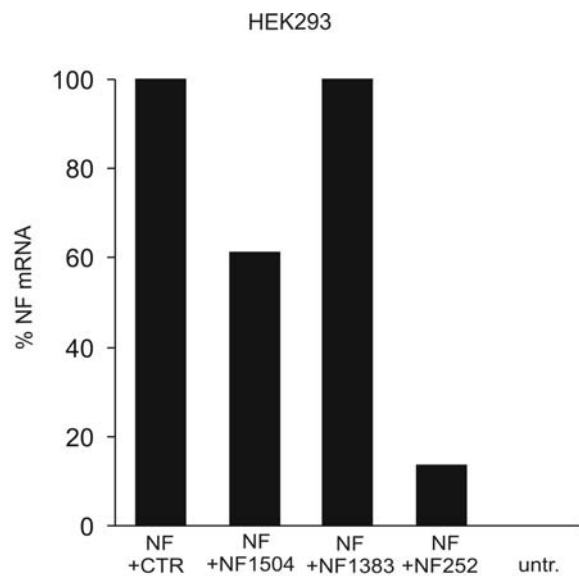


Abbildung 22 – Prävalidierung NF-spezifischer shRNA-Vektoren mit quantitativer *Real-Time* PCR-Analyse. Die Kotransfektion von sh_NF252 bzw. sh_NF1504 und einem Neurofascin-Expressionsplasmid (NF) in HEK293-Zellen resultierte in einer reduzierten Expression der Neurofascin-mRNA. Nach Kotransfektion der Kontroll-shRNA sh_CTR war das NF-Expressionslevel unverändert. Ebenso war sh_NF1383 ineffektiv. Untransfizierte HEK293-Zellen (untr.) exprimierten Neurofascin nicht.

analysiert. Nach Transfektion von HEK293-Zellen mit sh_NF252 war die Neurofascin-mRNA-Expression auf 13 % reduziert (Abbildung 22). Ebenso hatte die Expression der Neurofascin-mRNA nach Transfektion des sh_NF1504-Vektors von 100 % auf 61 % abgenommen. Im Gegensatz dazu zeigte sh_NF1383 ebenso wie die Kontroll-shRNA sh_CTR keine Interferenz mit der Neurofascin-Expression. In untransfizierten HEK293-Zellen konnte keine Neurofascin-mRNA nachgewiesen werden (Abbildung 22).

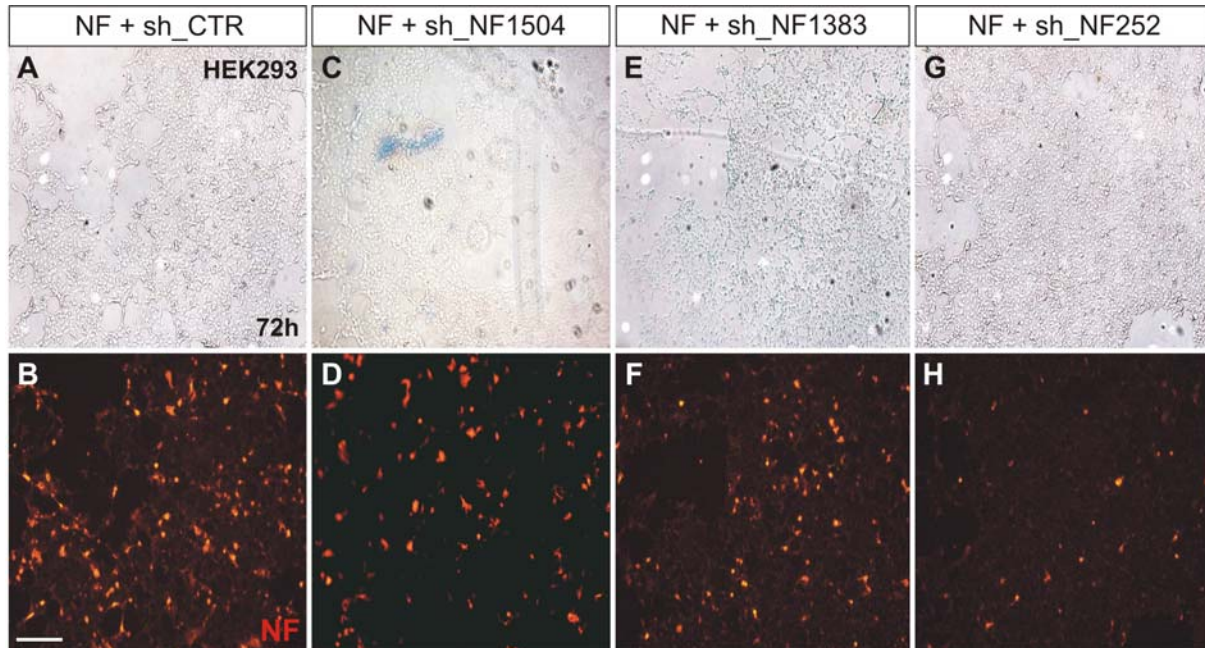


Abbildung 23 – Prävalidierung Neurofascin-spezifischer shRNA-Vektoren 72 h nach Transfektion mittels Immunzytochemie. (A–G) Durchlichtaufnahmen der in (B–H) dargestellten Fluoreszenzaufnahmen Neurofascin (NF)-gefärbter HEK293-Zellen. (B) Mit einem Neurofascin-Expressionsplasmid transfizierte Zellen zeigen bei Koexpression der Kontroll-shRNA (sh_CTR) ein NF-immunreaktives Signal. (D, F, H) Nach Transfektion Neurofascin-spezifischer shRNA-Vektoren hat die Zahl Neurofascin-positiver Zellen abgenommen. (H) sh_NF252 erzielt dabei die beste Effizienz. Maßstab: 120 µm.

Des Weiteren wurde der shRNA-vermittelte Knockdown der Neurofascin-Expression in HEK293-Zellen auf Proteinebene untersucht. Mit Hilfe eines Neurofascin-spezifischen Antikörpers wurde 72 h nach Transfektion der shRNA-Vektoren und Neurofascin-Expressionsvektoren (Abbildung 23) das Neurofascin-Protein nachgewiesen. Mit sh_CTR transfizierte Zellen zeigten 72 h nach Transfektion ein Neurofascin-positives Signal (Abbildung 23 B). Im Gegensatz dazu war die Zahl Neurofascin-positiver HEK293-Zellen nach Transfektion von sh_NF252 zurückgegangen und nur noch bei wenigen Zellen konnte eine deutliche Neurofascin-Färbung beobachtet werden (Abbildung 23 H). Die shRNA-Vektoren sh_NF1383 und sh_NF1504 zeigten ebenfalls einen Effekt auf die Neurofascin-Expression. Dieser war allerdings im Vergleich zu sh_NF252 (Abbildung 23 D, F) deutlich schwächer. So waren mehr Neurofascin-positive Zellen zu erkennen als nach Transfektion von sh_NF252. Insgesamt wurde mit allen drei shRNAs ein Rückgang des Neurofascin-Proteinlevels beobachtet. Der shRNA-Vektor sh_NF252 lieferte dabei die beste Effizienz.

3.6.2 Validierung Neurofascin-spezifischer shRNA-Vektoren in hippocampalen Neuronen

3.6.2.1 Quantifizierung des Neurofascin-Knockdowns in primären Neuronen

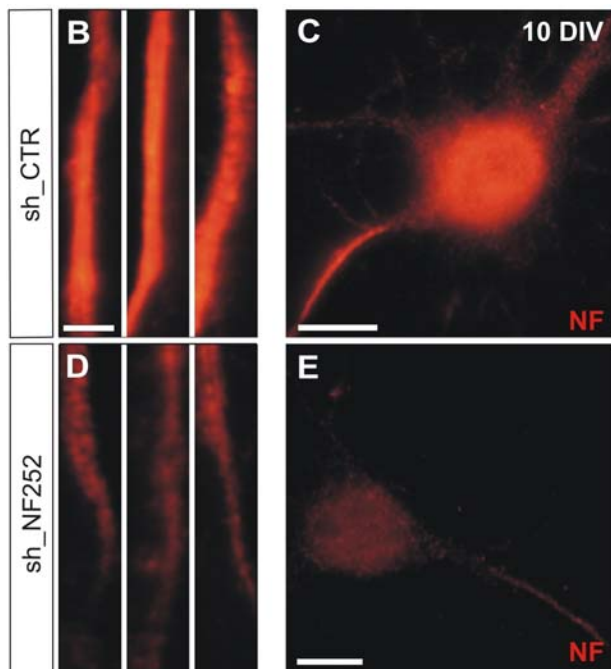
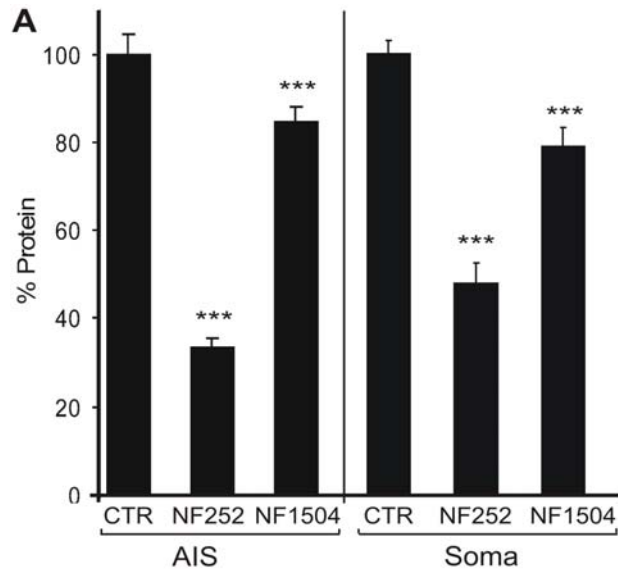


Abbildung 24 – shRNA-vermittelter Neurofascin-Knockdown in hippocampalen Neuronen. (A) NF252 und NF1504 reduzieren das Neurofascin-Proteinlevel signifikant in Soma und AIS im Gegensatz zur Kontrolle (sh_CTRL). (B–E) Repräsentative Abbildungen NF-gefärbter AIS und Somata Kontroll- bzw. shRNA-transfizierter Zellen. Maßstab: (B, D) 3 μ m; (C, E) 10 μ m. *** $p < 0.001$.

Primäre hippocampale Neurone wurden mit den validierten shRNA-Vektoren sh_NF252 bzw. sh_NF1504 transfiziert und die Expression von endogenem Neurofascin im AIS und Soma mit Hilfe quantitativer Immunzytochemie bestimmt. Der shRNA-Vektor sh_NF1383 wurde nicht in die Untersuchungen mit einbezogen, da dessen Knockdowneffizienz sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene als gering eingestuft wurde. Die Transfektion erfolgte am 4. DIV aufgrund einer guten Transfizierbarkeit und einer moderaten endogenen Neurofascin-Expression.

Erfolgreich transfizierte Neurone zeigten am 10. DIV eine deutlich schwächere Neurofascin-Expression als Neurone, die mit der Kontroll-shRNA (sh_CTRL) transfiziert wurden. Dies deutet auf eine Reduktion der endogenen Neurofascinproteinmenge hin (Abbildung 24). Die Quantifizierung des Neurofascin-Knockdowns mittels quantitativer Immunzytochemie ergab für sh_NF252 eine signifikante Reduktion auf 34 % und für sh_NF1504 auf 85 % des Kontrollwertes (100 %) am AIS (Abbildung 24 A). Am Soma war das Neurofascin-Proteinlevel für sh_NF252 auf 44 % und für sh_NF1504 auf 79 % im Vergleich zur Kontrolle reduziert. In Abbildung 24 B-E

sind beispielhaft Neurone dargestellt, die mit der Kontroll-shRNA bzw. Neurofascin-spezifischen shRNA (sh_NF252) transfiziert wurden. Zusammenfassend wurde mit den eingesetzten shRNA-Konstrukten ein partieller Knockdown der Neurofascin-Expression in dissoziierten hippocampalen Neuronen erzielt. Es handelt sich hierbei offenbar um einen spezifischen Effekt, da die eingesetzten shRNAs vollkommen unterschiedliche Zielsequenzen innerhalb der Neurofascin-mRNA adressieren (Kapitel 2.6.1.13).

3.6.2.2 Einfluß Neurofascin-spezifischer shRNA-Vektoren auf die Expression verwandter IgCAMs am Beispiel von L1

Die Induktion von RNA-Interferenz in Säugerzellen birgt das Risiko, sogenannte Nebeneffekte („Off-Target“-Effekte) hervorzurufen. Diese werden u. a. durch eine unspezifische Bindung und Degradation anderer homologer mRNAs neben der eigentlichen Ziel-mRNA verursacht und können zu einer unerwünschten Herunterregulation anderer Gene führen. Um die Spezifität der gegen Neurofascin-gerichteten shRNA-Plasmide zu prüfen und um „Off-Target“-Effekte auszuschließen, wurde deren Einfluß auf die Expression des eng verwandten CAMs L1 immunzytochemisch untersucht. Hierzu wurde die L1-Expression am AIS 10 DIV kultivierter hippocampaler Neurone, die am 4. DIV mit shRNA-Vektoren transfiziert worden waren, quantifiziert (Kapitel 2.6.6). Wie in Abbildung 25 dargestellt, hatte die Transfektion Neurofascin-spezifischer shRNAs keinen Effekt auf die Expression von L1. Im Vergleich zur Kontroll-shRNA (sh_CTRL: 100 % ± 3 %, $n=22$) waren nach Transfektion von sh_NF252 (107 % ± 3 %, $n=18$) und sh_NF1504 (107 % ± 3 %, $n=18$) die L1-Proteinlevel am Axon nicht signifikant verändert. Dies konnte durch eine ANOVA-Analyse bestätigt werden. Es wird deshalb angenommen, dass Mitglieder der IgCAM-Superfamilie durch Transfektion von sh_NF252 bzw. sh_NF1504 nicht in ihrer Expression beeinträchtigt werden. Somit handelt es sich um einen spezifischen shRNA-vermittelten Knockdown des CAMs Neurofascin.

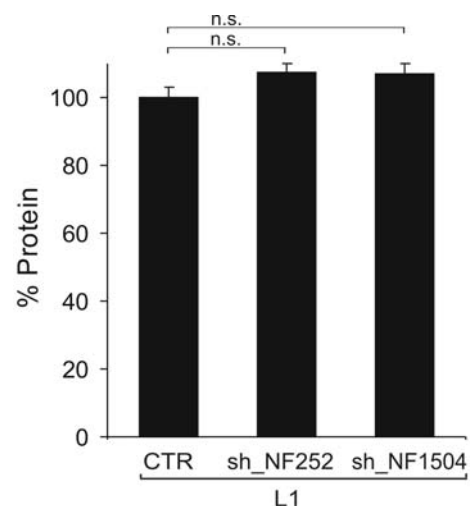


Abbildung 25 – Expression von L1 nach Transfektion Neurofascin-spezifischer shRNA-Konstrukte. Neurofascin-spezifische shRNAs beeinträchtigten die Expression des homologen Proteins L1 nicht signifikant (CTR: 100 % ± 3 %, $n=22$; sh_NF252: 107 % ± 3 %, $n=18$; sh_NF1504: 107 % ± 3 %, $n=18$). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

3.6.3 Funktionelle Charakterisierung des Neurofascin-Knockdowns

3.6.3.1 Einfluß des Neurofascin-Knockdowns auf die Entstehung von Gephyrinclustern in hippocampalen Neuronen

Die Experimente der Kapitel 3.3 bis 3.5 stellen Überexpressionsversuche dar, mit welchen die Rolle Neurofascins für die Gephyrincluster-Bildung analysiert wurde. Daneben können auch Funktionsverluststudien zur weiteren Aufklärung dieser Fragestellung beitragen. Mit

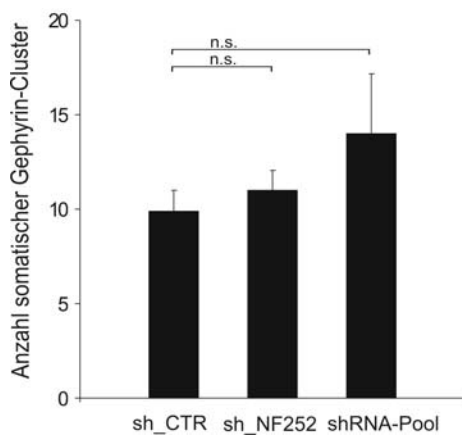


Abbildung 26 – Anzahl der Gephyrincluster auf dem Zellkörper nach Neurofascin-Knockdown. Die Herunterregulation von Neurofascin durch sh_NF252 (11.0 ± 1.1 , $n=89$) bzw. des shRNA-Pools (sh_NF252, NF1504 und sh_NF1383 (14.0 ± 3.2 , $n=90$)) beeinflusste die Zahl der Gephyrincluster auf dem Zellkörper im Vergleich zu Kontrollzellen nicht signifikant (sh_CTRL: 9.9 ± 1.1 , $n=73$). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

dem folgenden Experiment sollte untersucht werden, wie sich ein shRNA-vermittelter Knockdown von Neurofascin auf die Bildung somatischer Gephyrincluster in dissoziierten hippocampalen Neuronen auswirkt. Hierzu wurden 4 DIV kultivierte hippocampale Neurone mit Neurofascin-spezifischen shRNA-Vektoren transfiziert. Sechs Tage später erfolgte die mikroskopgestützte Aufnahme der Somata transfizierter und mit Gephyrin-Antikörper behandelter Zellen. Unter Verwendung des Plugins „Draw Roi“ der Software ImageJ 1.34s wurde die Zahl der Gephyrincluster auf dem Soma transfizierter Neurone bestimmt. Mit Kontroll-shRNA transfizierte Zellen (sh_CTRL: $n=73$) besaßen am 10. DIV auf ihrem Soma im Mittel eine Anzahl von 9.9 ± 1.1 Gephyrinclustern (Abbildung 26). Die Transfektion von sh_NF252 ($n=89$) resultierte in keiner signifikanten Veränderung. Hier wurden durchschnittlich 11.0 ± 1.1 Gephyrincluster auf dem neuronalen Zellkörper bestimmt. Des Weiteren wurden Zellen mit einem Gemisch aus allen drei beschriebenen shRNA-

Plasmiden transfiziert (shRNA-Pool, $n=90$). Nach Transfektion des shRNA-Pools war die Zahl der Gephyrincluster auf durchschnittlich 14.0 ± 3.2 Cluster pro Soma erhöht. Die ANOVA-Analyse ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle. Folglich hat ein partieller Knockdown von Neurofascin keinen signifikanten Einfluß auf die Bildung von Gephyrinclustern.

3.6.3.2 Einfluß des Neurofascin-Knockdowns auf die Lokalisation von Gephyrinclustern in hippocampalen Neuronen

Dissoziierte hippocampale Neurone wurden am 4. DIV mit den shRNA-Vektoren sh_NF252 und sh_NF1504 transfiziert. Sechs Tage später, am 10. DIV, wurden ausschließlich transfizierte Neurone hinsichtlich ihrer Gephyrincluster-Lokalisation analysiert. Wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben, erfolgte eine Unterteilung in drei Klassen: Neurone, deren Somata lokalisierte Gephyrincluster am Axonhügel aufwiesen („lokalisiert“) wurden unterschieden von solchen mit einer zufälligen Verteilung am Soma („randomisiert“) bzw. von Neuronen ohne Gephyrincluster („fehlend“). In Abbildung 27 sind repräsentative Neurone mit lokalisierter bzw. randomisierter Verteilung der Gephyrincluster nach Transfektion mit sh_CTR bzw. sh_NF252 dargestellt.

Neurone, die mit der Kontroll-shRNA transfiziert wurden, zeigten keine Abweichungen hinsichtlich der Lokalisation und Bildung ihrer Gephyrincluster. Die Expression Neurofascin-spezifischer shRNAs verhinderte die Gephyrincluster-Bildung nicht signifikant. So unterschied sich der Anteil der Zellen ohne Cluster nicht wesentlich von der Kontrollsituation (sh_CTR: 6 %; sh_NF252: 10 %; sh_NF1504: 3 %). Ein partieller Verlust der Neurofascin-Funktion scheint somit nicht mit einer reduzierten Clusterbildung einher zu gehen. Außerdem unterschieden sich die mit Kontroll-shRNA bzw. Neurofascin-spezifischen-shRNAs transfizierten Neurone nicht in der Anzahl ihrer Gephyrincluster (Kapitel 3.6.3.1). Jedoch verringerte der Neurofascin-Knockdown den Anteil der Zellen mit korrekter Gephyrincluster-Lokalisation am Axonhügel um etwa die Hälfte. So besaßen nach Transfektion von sh_CTR

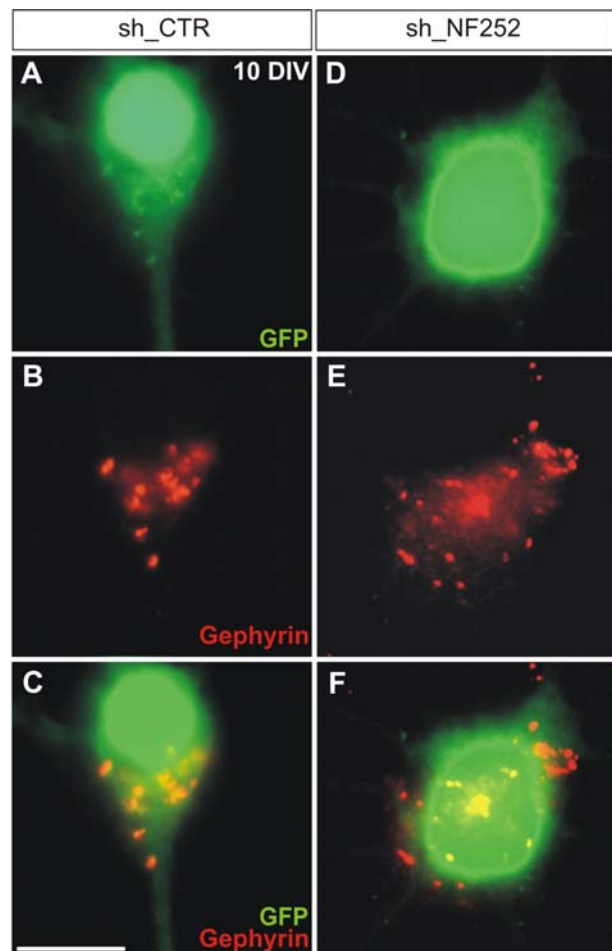


Abbildung 27 – Somatische Gephyrin-Verteilung nach Expression Neurofascin-spezifischer shRNAs. (A–C) Nach Transfektion von sh_CTR akkumulieren Gephyrincluster am Axonhügel. (D–F) Gestörte Lokalisation von Gephyrin nach Transfektion von sh_NF252. Gephyrincluster zeigten eine zufällige Verteilung auf dem Soma. (A, D) Transfizierte Zellen exprimierten GFP. (B, E) Gephyrincluster sind in rot dargestellt. (C, F) Mischbild: (A, B) bzw. (D, E) Fluoreszenzkanäle überlagert. Maßstab: 10 µm.

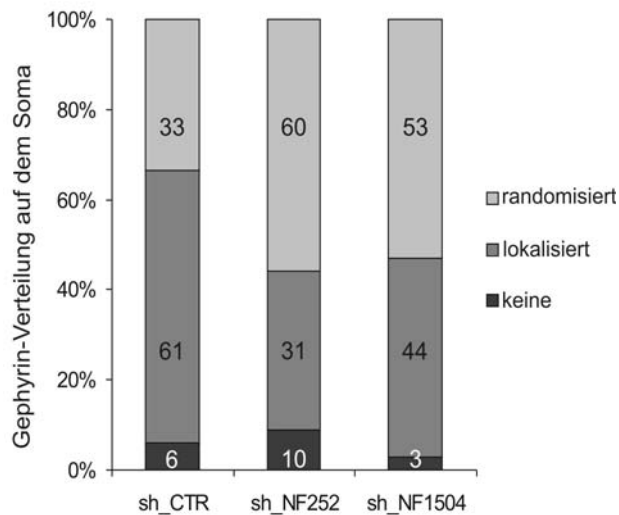


Abbildung 28 – Somatische Gephyrin-Verteilung nach shRNA-vermitteltem Knockdown von Neurofascin. Nach Neurofascin-Knockdown war ein signifikanter Anstieg hippocampaler Neurone mit „randomisierten“ Gephyrinclustern auf dem Soma zu verzeichnen (sh_NF252: $n=134$; $p<0.0001$; sh_NF1504: $n=44$; $p<0.001$). So stieg die Anzahl der Zellen von 33 % bei der Kontrolle (sh_CTRL: $n=105$) auf 60 % mit sh_NF252 bzw. 53 % mit sh_1504.

($n=105$) 61 % der Neurone lokalisierte Gephyrincluster, während es nach Transfektion von sh_NF252 ($n=134$; $p<0.0001$) lediglich 31 % waren (Abbildung 28). Mit dem shRNA-Vektor NF1504 konnten diese Ergebnisse reproduziert werden. Wenn auch in geringerem Maße, so war der Anteil der Zellen mit korrekter Gephyrincluster-Lokalisation nach Transfektion von sh_NF1504 ($n=44$; $p<0.001$) auf 44 % gesunken, was in Übereinstimmung mit der geringeren Knockdown-Effizienz ist. Da die eingesetzten shRNAs vollständig unterschiedliche Zielsequenzen innerhalb der Neurofascin-mRNA adressieren (Kapitel 2.6.1.13), können „Off-Target“-Effekte ausgeschlossen werden. Da sowohl mit sh_NF252 als auch mit sh_NF1504 derselbe biologische Effekt beobachtet werden

konnte, spricht dies für einen spezifischen Effekt, welcher auf die Degradation der Neurofascin-mRNA zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse deuten auf eine mögliche Funktion von Neurofascin bei der Translokation von Gephyrin an den Axonhügel zwischen dem 4. DIV und 10. DIV hin.

3.6.4 Nachweis der Spezifität Neurofascin-gerichteter shRNAs auf funktioneller Ebene

3.6.4.1 Integrität des Axoninitialsegmentes nach shRNA-vermitteltem Neurofascin-Knockdown

Das Axoninitalsegment eines Pyramidenneurons ist eine wesentliche Komponente für dessen Aktivität. Auf diesem subzellulären Kompartiment erfolgt die Generierung von Aktionspotentialen und deren Weiterleitung (Inda *et al.*, 2006). Für die Akkumulation von AIS-Komponenten, wie etwa spannungsabhängigen Natriumkanälen, β IV-Spektrinen sowie der CAMs Neurofascin und NrCAM, ist das Zytoskelettprotein Ankyrin_G verantwortlich.

So führt ein Knockdown von Ankyrin_G unter anderem zu einem Verlust von Neurofascin am AIS dissoziierter hippocampaler Neurone *in vitro* (Hedstrom *et al.*, 2007). Um ausschliessen zu können, dass die bei Neurofascin-Knockdown beobachtete anomale Gephyrincluster-Verteilung durch eine Störung der AIS-Integrität hervorgerufen wird, wurden 4 DIV kultivierte hippocampale Neurone mit den beschriebenen shRNA-Vektoren transfiziert. Am 10. DIV wurde die Ankyrin_G-Expression immunzytochemisch untersucht. Das Expressionsmuster von Ankyrin_G in transfizierten Neuronen wurde durch die Expression Neurofascin-spezifischer shRNA nicht signifikant verändert und Ankyrin_G lokalisierte wie erwartet am AIS transfizierter Zellen (Abbildung 29 A-C). Ebenfalls unterschied sich die Zahl der Zellen mit Ankyrin_G-

positivem AIS nach Neurofascin-Knockdown nicht signifikant von den Kontrollzellen (Abbildung 29 D). So zeigten im Vergleich zu 93 % bei den Kontrollzellen (sh_CTRL: $n=59$) 87 % der mit sh_NF252-transfizierten Zellen ($n=45$) und 89 % der mit sh_NF1504-transfizierten Zellen ($n=46$) ein Ankyrin_G-Signal am AIS. Demnach blieb die anhand des

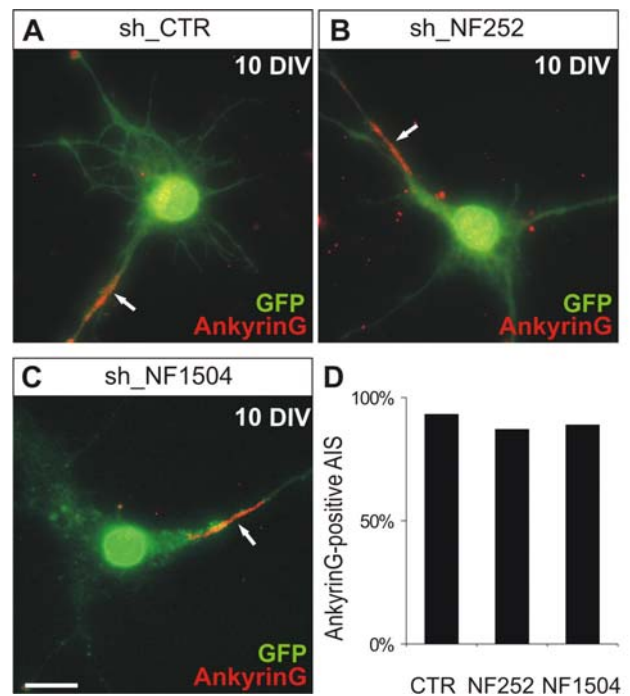


Abbildung 29 - Lokalisation und Expression von Ankyrin_G nach Neurofascin-Knockdown. (A-C) Die Transfektion Neurofascin-spezifischer shRNAs beeinträchtigte die Expression und Lokalisation von Ankyrin_G am AIS (Pfeil) 10 DIV kultivierter hippocampaler Neurone nicht. (D) Quantifizierung transfizierter Neurone mit Ankyrin_G-positivem AIS (sh_CTRL: $n=59$, 93 %; sh_NF252: $n=45$, 87 %; sh_NF1504: $n=46$, 89 %; χ^2 -Test). Maßstab: 10 μ m.

Ankyrin_G-Signals gemessene AIS-Integrität bei Herunterregulation der Neurofascin-Expression erhalten. Folglich wird die anomale Gephyrin-Lokalisation nicht aufgrund eines destabilisierten AIS verursacht. Vielmehr deutet dies auf eine spezifische Funktion von Neurofascin bei der Lokalisation von Gephyrin hin.

3.6.4.2 Bestimmung der Anzahl exzitatorischer Strukturen auf Dendriten nach Neurofascin-Knockdown

Um eine Aussage über die Spezifität des CAMs Neurofascin für die inhibitorische Synaptogenese treffen zu können, wurde der Einfluß des Neurofascin-Knockdowns auf die Clusterbildung exzitatorischer postsynaptischer Gerüstproteine (PSD-95) auf Dendriten untersucht.

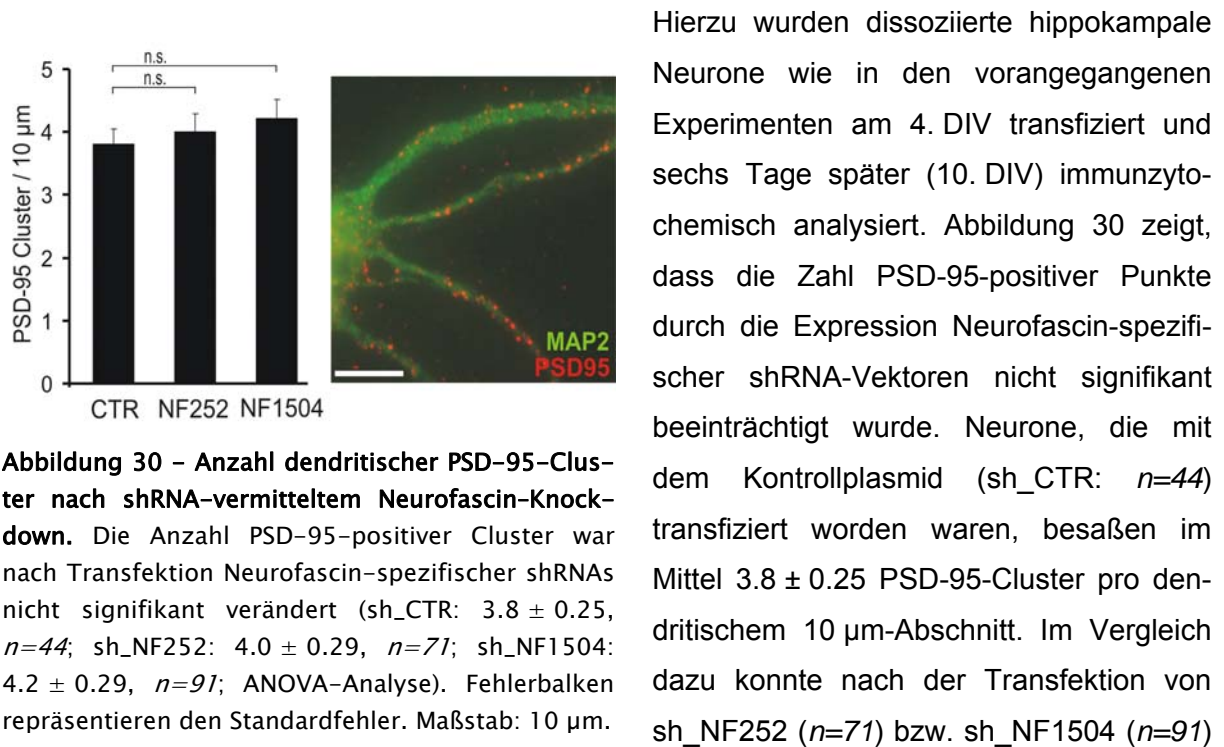


Abbildung 30 – Anzahl dendritischer PSD-95-Cluster nach shRNA-vermitteltem Neurofascin-Knockdown. Die Anzahl PSD-95-positiver Cluster war nach Transfektion Neurofascin-spezifischer shRNAs nicht signifikant verändert (sh_CTRL: 3.8 ± 0.25 , $n=44$; sh_NF252: 4.0 ± 0.29 , $n=71$; sh_NF1504: 4.2 ± 0.29 , $n=91$; ANOVA-Analyse). Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Maßstab: 10 µm.

eine durchschnittliche Anzahl von 4.0 ± 0.29 bzw. 4.2 ± 0.29 PSD-95-Clustern bestimmt werden. PSD-95-Cluster konnten zu keinem der untersuchten Zeitpunkte auf dem AIS detektiert werden (siehe Kapitel 3.1.3) und waren ausschließlich auf MAP2-positiven Dendriten lokalisiert. Diese waren wiederum frei von Neurofascin. Somit kann Neurofascin nicht bei der Clusterbildung exzitatorischer postsynaptischer Strukturen beteiligt sein und fungiert offensichtlich spezifisch bei der inhibitorischen Synaptogenese.

3.6.4.3 „Rescue“ anomal lokalisierter Gephyrincluster durch Koexpression von NF166

Die durch den Einsatz der shRNA-Vektoren beobachtete beeinträchtigte Synapsenlokalisierung könnte nicht nur auf der Interferenz der shRNA mit der spezifischen Neurofascin-mRNA beruhen, sondern auch auf „Off-Target“-Effekte zurückzuführen sein. Um dies auszuschließen, wurde ein sogenanntes „Rescue“-Experiment durchgeführt. Mit diesem sollten die shRNA-vermittelten Effekte durch eine simultane Überexpression der Neurofascin-Isoform NF166 aufgehoben werden. NF166 enthält Neurofascin-Sequenzen aus dem Huhn, die nicht von der spezifisch gegen Ratten-Neurofascin gerichteten shRNA_NF252 adressiert werden. Damit sollte die Expression von NF166 durch den Einsatz der shRNA nicht inhibiert werden. Gleichzeitig sollte in diesem Zusammenhang NF-5^{te} FN-III als aktive Neurofascin-Isoform dargestellt werden.

Dissoziierte hippocampale Neurone wurden am 4. DIV mit dem shRNA-Plasmid sh_NF252 transfiziert. Zusätzlich wurde ein Teil mit NF166 kotransfiziert und die Gephyrincluster-Verteilung am 10. DIV untersucht. Der Anteil korrekt lokalisierter Gephyrincluster hatte durch die Expression von Huhn-NF166 ($n=100$) in Anwesenheit von sh_NF252 signifikant auf 63 % ($p<0.01$) zugenommen (Abbildung 31). Im Vergleich dazu besaßen nur 46 % ($n=83$) der Zellen lokalisierte Gephyrincluster, wenn die endogene Neurofascin-Expression durch sh_NF252 herunterreguliert wurde (siehe auch Abbildung 28). Ein „Off-Target“-Effekt, der für die veränderte Synapsenlokalisierung verantwortlich sein könnte, ist somit unwahrscheinlich. Dieses Ergebnis zeigt, dass der beobachtete Phänotyp spezifisch auf den Neurofascin-Knockdown zurückzuführen ist. Die Expression von NF166 (NF-5^{te} FN-III) als verantwortliche Isoform ist hinreichend für eine funktionelle Wiederherstellung anomal translozierter Gephyrincluster. Dies deutet darauf hin, dass Neurofascin nicht nur notwendig für die Clusterbildung, sondern auch hinreichend für die Translokation von Gephyrin an den Axonhügel ist.

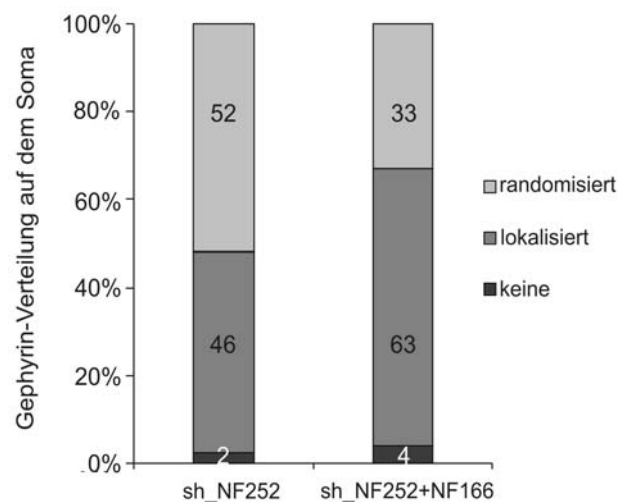


Abbildung 31 - Wiederherstellung des ursprünglichen Phänotyps durch Koexpression von NF166 aus dem Huhn. Expression von NF166 in Anwesenheit von sh_NF252, welches spezifisch gegen endogenes Neurofascin der Ratte gerichtet ist, erhöht den Anteil der Zellen mit korrekt lokalisierten Gephyrinclustern am Soma signifikant (sh_NF252: $n=83$; sh_NF252 + NF166: $n=100$, $p<0.01$, χ^2 -Test).

3.7 Untersuchung der Interaktion zwischen Neurofascin und Gephyrin

3.7.1 Einfluß von Neurofascin auf die Aggregation von GFP-Gephyrin am AIS hippocampaler Neurone

Der shRNA-vermittelte Funktionsverlust von Neurofascin ging mit einer anomalen somatischen Lokalisation der Gephyrincluster in dissoziierten hippocampalen Neuronen einher. Um den Beitrag von Neurofascin für die Translokation von Gephyrin an den Axonhügel detaillierter zu untersuchen, wurden dissoziierte hippocampale Neurone mit einem GFP-Gephyrin-Expressionsplasmid transient transfiziert. Dies ermöglichte den Nachweis von Gephyrin in der Immunfluoreszenz ohne spezifische Antikörper, da in der transfizierten Zelle ein rekombinantes Fusionsprotein (GFP-Gephyrin) gebildet wird, welches N-Terminal mit dem „Green Fluorescent Protein“ (GFP) markiert ist. Die subzelluläre Lokalisation von transfiziertem Gephyrin konnte somit direkt über die Visualisierung des GFP-Tags erfolgen. Des Weiteren erfolgt die Expression von GFP-Gephyrin konstitutiv unter der Kontrolle des CMV-Promotors, so dass unabhängig vom Entwicklungsstadium der Zelle GFP-Gephyrin synthetisiert wird.

Die exogene Überexpression von GFP-Gephyrin in hippocampalen Neuronen wurde bereits zur Untersuchung der Transportdynamik von Gephyrin in hippocampalen Neuronen sowie für Interaktionsstudien herangezogen, z.B. um eine Interaktion von endogenem Gephyrin mit Glyzin- und GABA_A-Rezeptoren am postsynaptischen Komplex zu untersuchen (Maas *et al.*, 2006; Lardi-Studler & Fritschy, 2007). Diese Untersuchungen richteten ihren Fokus jedoch auf dendritisches Gephyrin. Im folgenden Experiment wurde untersucht, inwieweit die Expression von Neurofascin Einfluß auf die Translokation von exogen überexprimiertem Gephyrin am Soma bzw. AIS nimmt. Des Weiteren sollte es eine Aussage über eine mögliche Interaktion beider Proteine ermöglichen.

Hippocampale Neurone, die am 4. DIV mit einem GFP-Gephyrin-Plasmid transfiziert wurden, zeigten am 10. DIV wie endogenes Gephyrin die Eigenschaft der „Selbstaggregation“, d.h. die Tendenz, in Clustern vorzuliegen. Hierbei war auffallend, dass sich die subzelluläre Lokalisation der GFP-Gephyrincluster im Vergleich zu endogenem Gephyrin am 10. DIV nicht ausschließlich auf den Axonhügel beschränkte, sondern auf den gesamten Zellkörper und das AIS ausdehnte (Abbildung 32 A, B). Dendritische Kompartimente waren zu diesem Zeitpunkt jedoch negativ für GFP-Gephyrin. Somit entsprach die Lokalisation des exogen über-

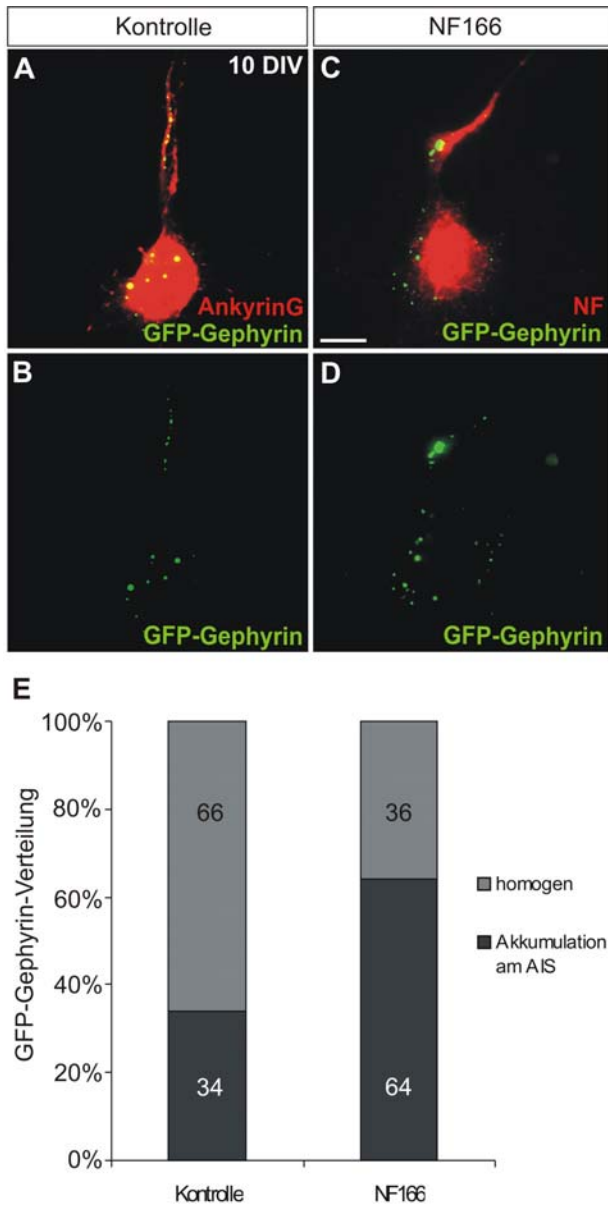


Abbildung 32 - GFP-Gephyrin-Lokalisation nach Kotransfektion von NF166. (A-D) GFP-Gephyrin-transfiziertes Neuron ohne bzw. mit Koexpression von NF166. (E) Quantifizierung transfizierter Zellen hinsichtlich der GFP-Gephyrin-Verteilung auf dem AIS. Die Zahl transfizierter Zellen mit einer homogenen Verteilung von GFP-Gephyrin auf dem AIS war nach Transfektion von NF166 auf 36 % reduziert im Vergleich zu 66 % bei Kontrollzellen ($n=53$) ($n=39$; $p<0.005$, χ^2 -Test). Maßstab: 10 μ m.

exprimierten GFP-Gephyrins in hippocampalen Neuronen nicht derjenigen des endogenen Proteins am 10. DIV. Sie war jedoch spezifisch auf die Neurofascin-positiven subzellulären Kompartimente hippocampaler Neurone begrenzt. Dies deutet auf einen Zusammenhang zwischen subzellulärer Neurofascin-Expression und lokal begrenzter GFP-Gephyrin-Verteilung hin.

Nach Kotransfektion von NF166 lokalisierten die GFP-Gephyrincluster in transfizierten Zellen wie in Kontrollzellen am Soma und AIS. Auffallend war jedoch, dass ein Großteil der Zellen flächige GFP-Gephyrin-Aggregate am AIS aufwies, was auf eine Akkumulation von GFP-Gephyrin am AIS hindeutete (Abbildung 32 C, D). Demnach wurden Zellen hinsichtlich ihrer GFP-Gephyrin-Lokalisation am AIS analysiert. Transfizierte Neurone, deren GFP-Cluster am AIS eine vergleichbare Fläche wie die somatischen Cluster einnahmen, wurden unterschieden von Neuronen, die am AIS eine visuelle Akkumulation von GFP-Gephyrin zeigten. Diese war an einer Zunahme der GFP-Gephyrincluster-Größe am AIS, verglichen mit somatischen Clustern, zu erkennen. Die Quantifizierung ergab eine signifikante Zunahme des prozentualen Zellanteils mit einer GFP-Gephyrin-Akkumulation am AIS nach der Kotransfektion von NF166 (Abbildung 32 E). So stieg der Anteil von 34 % bei alleiniger

GFP-Gephyrin-Expression (Kontrolle: $n=53$) auf 64 % an, wenn NF166 ($n=39$, $p<0.005$) koexprimiert wurde. In Abbildung 32 C und D ist beispielhaft ein mit NF166 transfiziertes hippocampales Neuron dargestellt, welches am AIS eine deutliche Akkumulation von GFP-Gephyrin aufweist.

Um den beobachteten Effekt quantifizieren zu können, wurde die Fläche von GFP-Gephyrin am AIS mit und ohne NF166-Koexpression bestimmt. Es wurde sowohl die durchschnittliche Gesamtfläche von GFP-Gephyrin auf dem AIS errechnet als auch die Fläche, die ein Gephyrincluster auf dem AIS im Mittel umfasst. Die Fläche eines GFP-Clusters am AIS betrug im Schnitt $1.2 \mu\text{m}^2$ nach Expression von GFP-Gephyrin (Kontrolle: $n=53$), während nach Koexpression von NF166 die durchschnittliche Fläche eines GFP-Gephyrinclusters auf $2.1 \mu\text{m}^2$ (NF166: $n=53$) angestiegen war (Abbildung 33 A, C). Der t -Test bestätigte den Unterschied

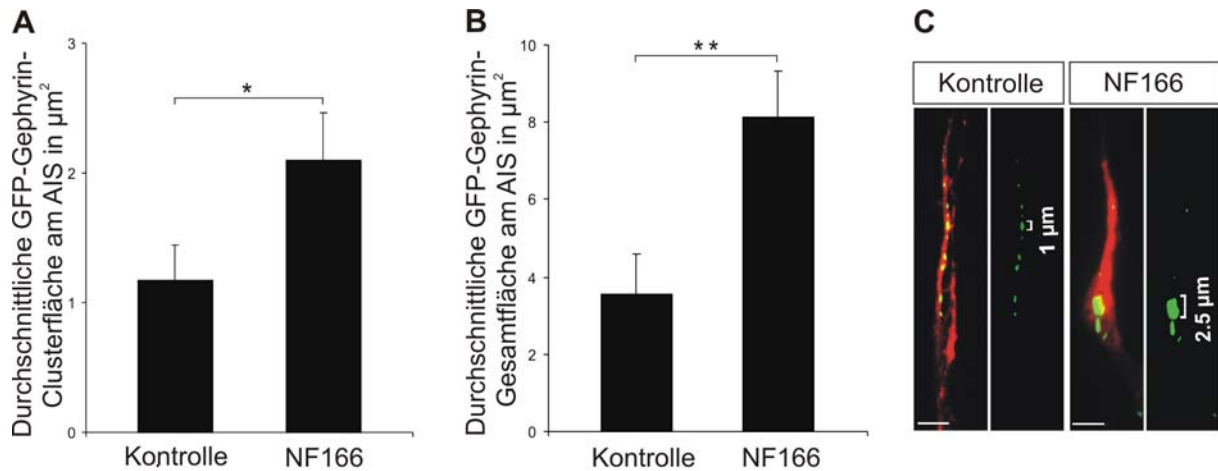


Abbildung 33 – Durchschnittliche Fläche der GFP-Gephyrincluster am AIS hippocampaler Neurone nach Transfektion von NF166. (A) Durchschnittliche GFP-Gephyrincluster-Fläche am AIS in Abhängigkeit von NF166. (B) Durchschnittliche GFP-Gephyrin Gesamtfläche am AIS in Abhängigkeit von NF166. Sowohl die durchschnittliche GFP-Gephyrincluster-Fläche als auch die Gesamtfläche von GFP-Gephyrin am AIS war nach Expression von NF166 um etwa das Doppelte angestiegen. (C) Vergrößerte Darstellung der Axoninitialsegmente transfizierter Neurone aus Abbildung 32 A–D.

mit einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$. Bei Betrachtung der GFP-Gephyrin-Gesamtfläche am AIS wurde ebenfalls eine signifikante Zunahme beobachtet. So betrug die Gesamtfläche von GFP-Gephyrin nach Transfektion von NF166 im Mittel $8.1 \mu\text{m}^2$ auf dem AIS, während die Fläche in Kontrollzellen lediglich $3.6 \mu\text{m}^2$ einnahm. Das Signifikanzniveau betrug in diesem Fall $p < 0.005$ (Abbildung 33 B, C). In Abbildung 33 C sind die AIS der in Abbildung 32 gezeigten Kontroll- bzw. NF166-transfizierten Zellen vergrößert dargestellt. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass NF-5^{te} FN-III die Translokation von GFP-Gephyrin ans AIS fördert.

3.7.2 Koexpression von Neurofascin und GFP-Gephyrin in PC12E2- bzw. HEK293-Zellen

Zur Untersuchung einer möglichen direkten Interaktion zwischen Neurofascin und Gephyrin wurden PC12E2-Zellen bzw. HEK293-Zellen mit einem GFP-Gephyrin-Fusionskonstrukt und der Huhn-Neurofascin-Isoform NF166 kotransfiziert (Kapitel 2.6.2.3 und 2.6.4.3). So konnten in der Vergangenheit Gephyrin-assoziierte Proteine in der Immunfluoreszenz unter *in vivo*-Bedingungen identifiziert werden (Kins et al., 1999; Kirsch et al., 1995; Meier et al., 2000). Umgekehrt wurden für Neurofascin-Interaktionsstudien vergleichbare Ligandenassays zur Identifizierung von Neurofascinliganden wie z.B. Syntenin-1 durchgeführt (Koroll *et al.*, 2001). Im Falle einer direkten Interaktion von Neurofascin mit Gephyrin wäre zu erwarten, dass exprimiertes GFP-Gephyrin mit koexprimiertem NF166 an der Plasmamembran kolokalisiert. Im Falle einer indirekten Interaktion ist eine Kolokalisation nur dann darstellbar, wenn die dafür notwendigen Komponenten auch in nicht-neuronalen Zellen existieren.

Gephyrin besitzt eine starke Tendenz zur Selbstaggregation und es ist bekannt, dass exogen überexprimiertes Gephyrin in nicht-neuronalen transfizierten Zellen große Proteinaggregate bildet. Mit Gephyrin interagierende Proteine reichern sich in diesen Clustern an. Zwei Tage nach Transfektion wurde Neurofascin in transfizierten PC12E2-Zellen mit einem spezifischen Huhn-Neurofascin-Antikörper nachgewiesen. Neurofascin lokalisierte wie erwartet als Zelloberflächenmolekül an der Zellmembran. Dies war deutlich an der ringförmigen Färbung in der konfokalen Laserscanaufnahme zu erkennen (Abbildung 34 D). Wurde Neurofascin mit Hilfe von Antikörpern geclustert, so waren membranständige Aggregate in der Immunfluoreszenz zu erkennen (Abbildung 34 A, G). Das überexprimierte GFP-Gephyrin war in der Immunfluoreszenz ausschließlich in aggregierter Form nachweisbar (Abbildung 34 D, H). Diese GFP-Gephyrincluster waren jedoch nicht submembranär lokalisiert, sondern konnten ausschließlich als intrazelluläre Aggregate in der Zelle beobachtet werden. Es war keine Kolokalisation des Neurofascin- und GFP-Gephyrin-Signals zu erkennen, wenn ein Mischbild aus beiden Fluoreszenzkanälen erzeugt wurde (Abbildung 34 F, I). Als Negativkontrolle wurde anstatt des GFP-Gephyrin-Plasmids ein GFP-Plasmid mit NF166 kotransfiziert. GFP wurde homogen in der Zelle exprimiert und bildete keine Aggregate, wenn NF166 an der Zellmembran geclustert wurde (Abbildung 34 B). Des Weiteren ist eine Interaktion zwischen Neurofascin und GFP nicht bekannt.

Dieses Resultat wurde in transfizierten HEK293-Zellen bestätigt (Abbildung 34 J-L). Auch in dieser Zelllinie gab es keine Kolokalisation von geclustertem NF166 und GFP-Gephyrin. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Neurofascin und Gephyrin nicht direkt miteinander in-

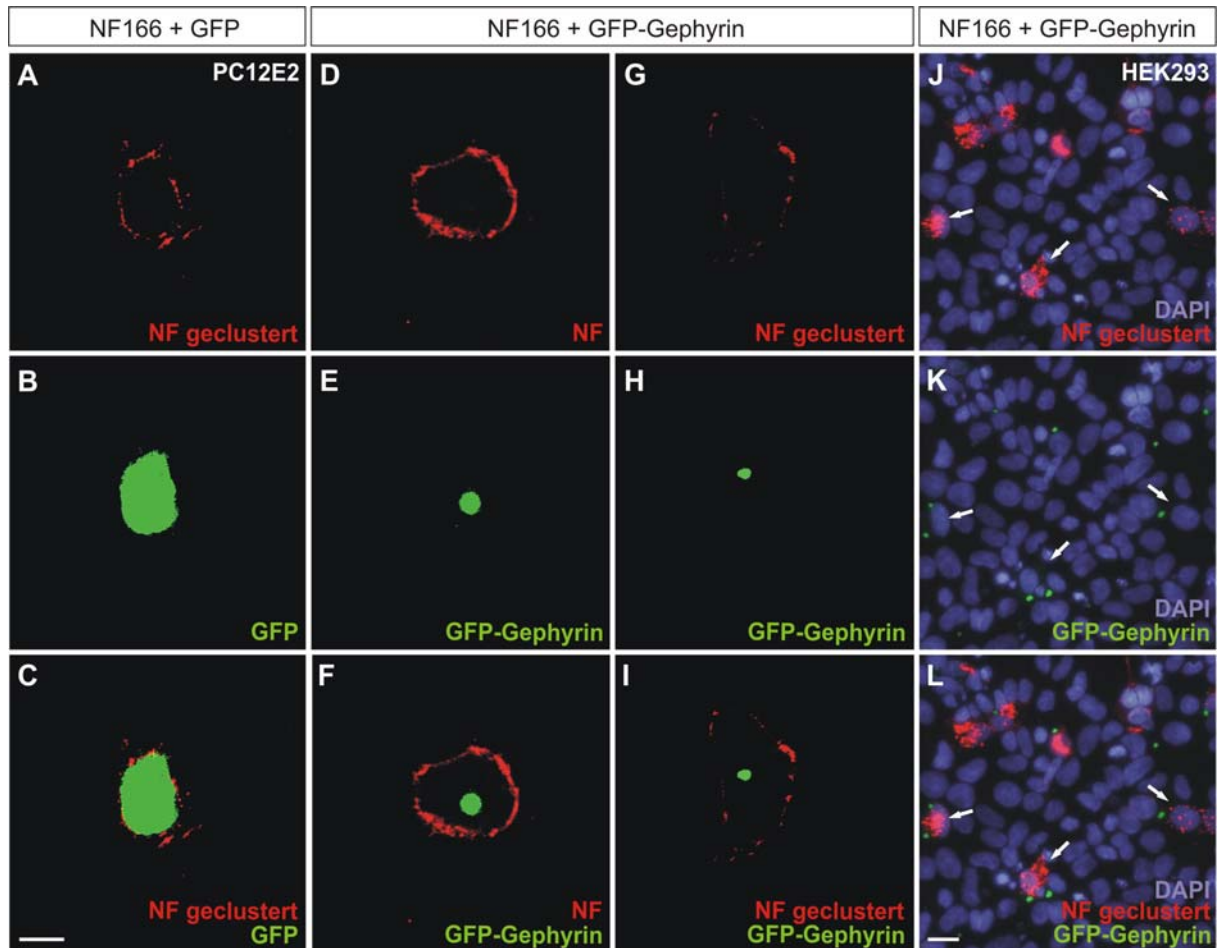


Abbildung 34 – Koexpression von GFP-Gephyrin bzw. GFP und NF166 in PC12E2- bzw. HEK293-Zellen. (A–I) PC12E2-Zellen. (A, D, G) Membranständige Lokalisation von geclustertem bzw. ungeclustertem NF166. (B) Lokalisation von GFP bzw. (E, H) Lokalisation von GFP-Gephyrin in intrazellulären Aggregaten. (C, F, I) Mischbilder beider Fluoreszenzkanäle. Maßstab: 10 µm. (J–L) Lokalisation von geclustertem NF166 (J, Pfeile) und GFP-Gephyrin (K, Pfeile) in HEK293-Zellen. Maßstab: 20 µm. GFP-Gephyrin kolokalisiert weder in transfizierten PC12E2- noch in HEK293-Zellen mit NF166. (A–I) Konfokale Laserscan-Aufnahmen. (J–L) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen.

teragieren. Allerdings handelt es sich sowohl bei PC12E2-Zellen als auch bei HEK293-Zellen um ein artifizielles System, in welchem notwendige essentielle neuronale Komponenten möglicherweise fehlen.

4 DISKUSSION

Die immunzytochemische Validierung des experimentellen Systems ergab, dass dissoziierte hippocampale Neurone in geringer Dichte geeignet sind, um den Beitrag von CAMs bei Prozessen der inhibitorischen Synaptogenese im ZNS zu untersuchen. Sowohl die Lokalisation des IgCAMs Neurofascin als auch die Verteilung exzitatorischer bzw. inhibitorischer synaptischer Proteine auf neuronalen subzellulären Kompartimenten entsprach der *in vivo*-Situation.

Es wurde gezeigt, dass die Bildung von Gephyrinclustern und ihre Translokation an den Axonhügel zu frühen Entwicklungszeitpunkten mit der Expression von Neurofascin auf dem Soma und AIS dissoziierter hippocampaler Neurone korrelieren. Die Expressionsanalyse ergab, dass hauptsächlich eine Neurofascin-Isoform während der frühen inhibitorischen Synaptogenese hippocampaler Neurone exprimiert wird. Dieser fehlt die fünfte Fibronectin-III ähnliche Domäne (NF-5^{te} FN-III). Im Gegensatz dazu konnte die neuronale Isoform NF186, welche die fünfte Fibronectin-III ähnliche Domäne enthält (NF+5^{te} FN-III), erst im adulten Rattengehirn nachgewiesen werden.

Die funktionelle Charakterisierung der Rolle Neurofascins ergab eine doppelte Funktion von Neurofascin im Hinblick auf die Bildung und Translokation von Gephyrinclustern. So ist die embryonale Neurofascin-Isoform NF-5^{te} FN-III (NF166) wichtig für die Induktion von Gephyrinclustern am Zellkörper. Dies konnte durch Überexpression der Isoform NF186 gezeigt werden, welche sich negativ auf die Bildung von Gephyrinclustern am Soma hippocampaler Neurone auswirkte. Des Weiteren ergab die Analyse von Neurofascin-Deletionsmutanten bzw. Punktmutanten, dass für die Bildung von Gephyrinclustern die zytoplasmatische Domäne zusammen mit der extrazellulären Domäne von NF-5^{te} FN-III notwendig ist.

Mit Hilfe eines shRNA-vermittelten Neurofascin-Knockdowns sowie eines „Rescue“-Experimentes wurde gezeigt, dass Neurofascin nicht nur notwendig, sondern auch hinreichend für die korrekte Lokalisation von Gephyrinclustern am Axonhügel dissoziierter hippocampaler Neurone ist. Ebenfalls förderte die Expression von NF-5^{te} FN-III (NF166) die Translokation von exogen exprimiertem GFP-Gephyrin an das AIS dissoziierter hippocampaler Neurone.

4.1 Hippokampale „Low-Density“ Neuronenkultur als *in vitro*-Modellsystem für die Untersuchung früher Prozesse der inhibitorischen Synaptogenese

Für die Untersuchung neuronaler Wachstums- und Reifungsprozesse stellt die von Goslin und Banker (1998) entwickelte hippokampale „Low-Density“ Neuronenkultur ein etabliertes *in vitro*-Modellsystem dar. Die resultierende Neuronenpopulation aus dissoziierten Hippokampi des Embryonalstadiums E18 ist verhältnismäßig homogen. So beträgt der Pyramidenzellanteil in etwa 85-90 %, während GABAerge Interneurone die restlichen 10-15 % darstellen (Benson *et al.*, 1994; Goslin & Banker, 1998). Da es sich um eine primäre Neuronenkultur handelt, bei welcher die Zellen unmittelbar aus dem Organismus stammen, spiegelt diese die *in vivo* Situation besser wider (Lowenstein *et al.*, 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe immunzytochemischer Untersuchungen gezeigt, dass dissoziierte hippokampale Neurone auch *in vitro* die Fähigkeit der Polarisierung aufweisen (Kapitel 3.1.1). Die asymmetrische Lokalisation der Strukturproteine MAP2, Neurofilament und Ankyrin_G in subzellulären Kompartimenten der Zelle ist für Neurone essentiell, um ihre funktionelle Architektur ausbilden zu können. So ist beispielsweise die Anreicherung von Ankyrin_G am AIS Voraussetzung für die Akkumulation von AIS-Komponenten wie spannungsgesteuerten Natriumkanälen, β IV-Spektrinen und Neurofascin (Dzhashvili *et al.*, 2007). Auf diese Weise wird die Grundlage für eine spezifische subzelluläre Lokalisation entstehender inhibitorischer Synapsen geschaffen (Craig & Banker, 1994; Ango *et al.*, 2004).

Das hippokampale „Low-Density“-Kultursystem wurde bereits an anderer Stelle zur Untersuchung der Entstehung exzitatorischer und inhibitorischer Synapsen herangezogen (Rao *et al.*, 2000; Christie & De Blas, 2003; Fritschy *et al.*, 2003; Goetze *et al.*, 2006). Die Kultivierung dissoziierter hippokampaler Neurone in geringer Dichte erlaubt eine bessere Visualisierung individueller Zellen und ihrer subzellulären Kompartimente, wie dem AIS, den Dendriten und der Synapsen (Goslin & Banker, 1998). Diese können somit isoliert betrachtet und analysiert werden. Darüber hinaus wird das zu untersuchende Zeitfenster durch eine geringe Dichte verlängert. Das heisst, Entwicklungsprozesse werden verlangsamt (Lee & Sheng, 2000). So ist die zeitliche Terminierung der Synapsenbildung abhängig von der Distanz, die ein auswachsendes Axon überwinden muss, um seine Zielzelle zu erreichen (van den Pol *et al.*, 1998). Demnach ist die Synapsenbildung in Kulturen geringer Dichte verzögert (Fletcher *et al.*, 1994). Hierdurch wird insbesondere eine detaillierte Beobachtung früher Prozesse der Synapsenbildung *in vitro* ermöglicht.

So konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals festgestellt werden, dass Gephyrincluster zu frühen Entwicklungszeitpunkten (10 DIV) am Axonhügel kultivierter hippocampaler Neurone lokalisiert sind (Abbildung 11 L). Craig et al. (1996) untersuchten ebenfalls die Gephyrincluster-Verteilung im Verlauf der Entwicklung. Hierbei zeigten 10 DIV kultivierte hippocampale Neurone eine vorwiegend axonale Gephyrin-Immunreaktivität, die sich im weiteren Verlauf der Entwicklung auf die Dendriten reifer hippocampaler Neurone ausweitete. Auch in der vorliegenden Arbeit waren zu späteren Entwicklungszeitpunkten (16.-25. DIV) Gephyrincluster auf dem AIS und den Dendriten zu erkennen (Abbildung 14 D). Die Dichte der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kulturen betrug lediglich 3.6 Zellen/mm². Im Gegensatz dazu verwendeten Craig et al. (1996) Neuronenkulturen mit einer Dichte von 7.2 Zellen/mm². Diese zeigen eine entsprechend zügigere Entwicklung in Kultur und repräsentierten deshalb möglicherweise eine fortgeschrittenere Entwicklung der Gephyrincluster-Verteilung.

Ebenfalls reflektierten dissoziierte hippocampale Neurone die *in vivo*-Lokalisation der IgCAMs NCAM, L1 und Neurofascin (Kapitel 3.1.2). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete axonale Lokalisation von L1 *in vitro* stimmt mit derjenigen im Hippokampus 1 bis 21 Tage alter Mäuse überein. L1 konnte dort ausschließlich auf dem Axon detektiert werden, während das L1-Signal auf Dendriten und Zellkörpern von Pyramidenzellen negativ war (Persohn & Schachner, 1990; Schuster *et al.*, 2001). NCAM-180 hingegen lokalisierte im Hippokampus 1 bis 8 Tage alter Mäuse auf den Zellkörpern und Dendriten. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete NCAM-Antikörper erkennt sowohl die 140 kDa als auch die 180 kDa große Isoform des NCAM-Proteines. Somit ist eine Unterscheidung der Isoformen nicht möglich. Die Lokalisation des CAMs Neurofascin beschränkte sich ab dem 10. DIV auf das Soma und AIS dissoziierter hippocampaler Neurone und glich derjenigen in organotypischen Schnittkulturen des Hippokampus (Abbildung 9). Auch für Purkinje-Zellen *in vivo* wurde diese Neurofascin-Lokalisation bereits beschrieben (Ango *et al.*, 2004). Das hippocampale „Low-Density“ Primärkulturmodell eignete sich deshalb zur Untersuchung des Beitrages von Neurofascin bei Prozessen der inhibitorischen Synaptogenese im ZNS.

4.2 Expression von Neurofascin zu frühen Zeitpunkten der inhibitorischen Synaptogenese

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass Neurofascin eine Schlüsselkomponente bei frühen Ereignissen der inhibitorischen Synaptogenese darstellt. Erste Hinweise für die Rolle des IgCAMs ergaben sich aus der Beobachtung, dass die Neurofascin- und Gephyrinexpression räumlich und zeitlich miteinander korrelieren (Kapitel 3.2.1). Die quantitative

Real Time PCR-Analyse ergab für Neurofascin einen Expressionsbeginn am 4. DIV (Kapitel 3.2.2). Hierbei war die Neurofascinexpression auf das Soma kultivierter hippocampaler Neurone begrenzt, was mittels Immunzytochemie dargestellt wurde (Kapitel 3.2.1). Zeitgleich wurde eine diffuse somatische Gephyrin-Immunreaktivität beobachtet (Kapitel 3.2, Abbildung 35). Die ersten Gephyrincluster wurden am 7. DIV am Axonhügel identifiziert. Zu diesem Zeitpunkt hatte bereits eine Anreicherung Neurofascins am AIS begonnen. Diese schritt in den folgenden Tagen fort, so dass am 10. DIV ein Neurofascin-positives AIS identifiziert werden konnte. Gleichzeitig hatte die Zahl der Gephyrincluster am Axonhügel zugenommen. Zu diesem Zeitpunkt war die exzitatorische Synaptogenese im Vergleich zur inhibitorischen Synapsenbildung weiter fortgeschritten (Kapitel 3.1.3.1). So existierten am 10. DIV somatodendritisch bereits exzitatorische prä- und postsynaptische Komponenten, die zusammengesetzt durchaus funktionell sein könnten.

Vollständige und funktionelle inhibitorische Synapsen existierten am 10. DIV jedoch nicht. Hierfür wird sowohl GAD65-positiver präsynaptischer Input benötigt als auch die dazugehörigen postsynaptischen Komponenten wie beispielsweise GABA_A-Rezeptoren und das Gerüstprotein Gephyrin. Am 10. DIV waren zwar GAD-positive Terminale und diffuse Cluster der GABA_A-Rezeptor β 2/3-Untereinheit bereits somatodendritisch vorhanden, jedoch beschränkte sich die Lokalisation des postsynaptischen Gerüstproteines Gephyrin ausschließ-

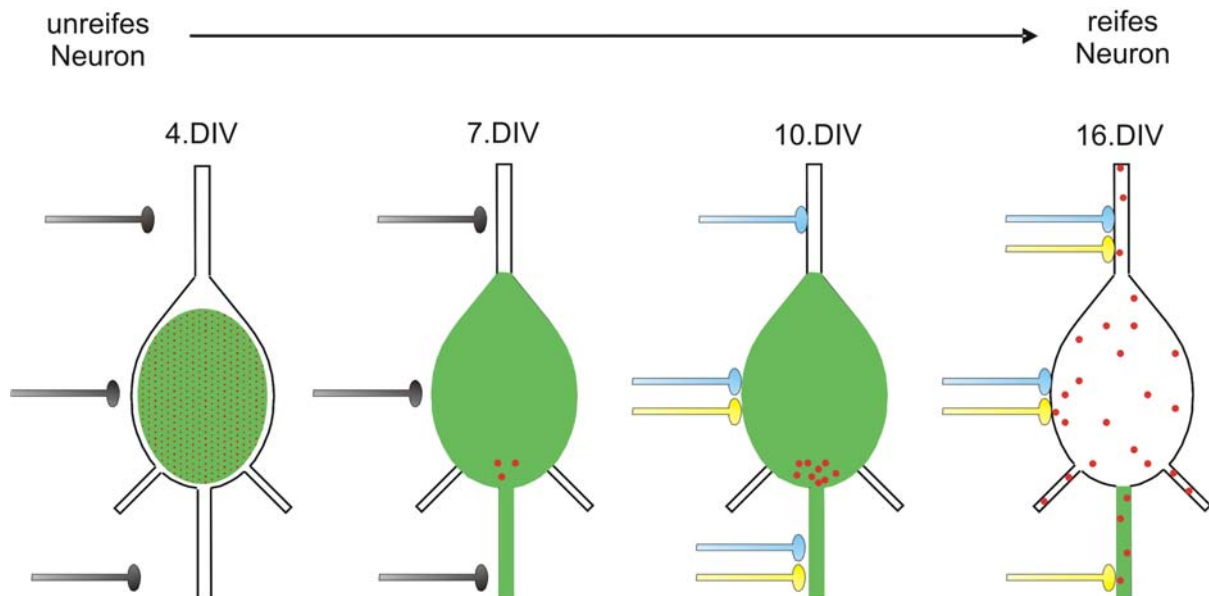


Abbildung 35 – Schema der zeitlichen Korrelation zwischen Neurofascin-Expression und der Clusterbildung von Gephyrin zu frühen Entwicklungszeitpunkten. Am 4. DIV zeigten Gephyrin (rot) und Neurofascin (grün) eine diffuse somatische Lokalisation. Die ersten Gephyrincluster waren am 7. DIV auf dem Axonhügel zu erkennen. Ihre Zahl hatte am 10. DIV zugenommen. In diesem Zeitraum erweiterte sich der Lokalisationsbereich von Neurofascin auf das AIS. Am 10. DIV fand sich sowohl GABAerge (gelb) als auch glutamaterge Input (blau) auf dem Soma und AIS. Erst am 16. DIV konnten neben dem Neurofascin-positiven AIS auch Gephyrincluster auf Dendriten identifiziert werden.

lich auf den Axonhügel. Erst zu einem sehr viel späteren Zeitpunkt (16-25 DIV) entsprach die Gephyrinlokalisierung derjenigen reifer Neurone (Kapitel 3.1.3.2 und 3.2.1). Da in reifen hippocampalen Neuronen die Mehrheit der synaptischen GABA_A-Rezeptor β 3-Untereinheiten mit Gephyrinclustern kolokalisiert, ist anzunehmen, dass es sich zu diesem Zeitpunkt um extrasynaptische Cluster der GABA_AR β 2/3-Untereinheit handelte und somit nicht um reife inhibitorische Synapsen (Danglot *et al.*, 2003). Dies deutet darauf hin, dass es sich um frühe Ereignisse der inhibitorischen Synaptogenese handeln muss. Zu frühen Entwicklungszeitpunkten waren zudem fehllokalisierte glutamaterge Terminale am AIS zu beobachten. Dabei stimmt die beobachtete Lokalisation präsynaptischer glutamaterger Präsynapsen zu frühen Entwicklungszeitpunkten mit Beobachtungen anderer Forschungsgruppen überein (Rao *et al.*, 2000; Christie & De Blas, 2003). Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse weisen deshalb daraufhin, dass zu frühen Zeitpunkten exprimiertes Neurofascin in Mechanismen vor der Reifung inhibitorischer Synapsen involviert ist und eine entscheidende Rolle bei der Gephyrincluster-Bildung und -Lokalisation spielt.

4.3 Expression entwicklungsabhängig exprimierter Neurofascin-Isoformen für die inhibitorische Synaptogenese

Das differentielle Spleißen der mRNA im Verlauf der Entwicklung stellt einen für Zelladhäsionsmoleküle charakteristischen Mechanismus zur Feinregulation der Ligandenbindung und Signalaktivität dar. Es können dadurch mehrere Proteinvarianten mit unterschiedlichen Funktionen generiert werden. Dies wurde in der Literatur für das IgCAM NCAM und seine 140 kDa bzw. 180 kDa großen Spleißvarianten beschrieben (Barbas *et al.*, 1988). NCAM180 unterscheidet sich dabei von NCAM140 durch eine zusätzliche 40 kDa große zytoplasmatische Domäne (Murray *et al.*, 1986). NCAM140 ist zu frühen Entwicklungszeitpunkten vorwiegend in den Wachstumskegeln und im Axonschaft sich entwickelnder Neurone lokalisiert und fördert das Neuritenwachstum (Persohn & Schachner, 1990; Maness & Schachner, 2007). Im Gegensatz dazu ist das später in der Entwicklung exprimierte NCAM180 an Zell-Zellkontakten und der PSD exzitatorischer Synapsen reifer Neurone zu finden (Persohn & Schachner, 1990). Buttner *et al.* (2004) berichten, dass NCAM180 das Neuritenwachstum aufgrund seiner starken Assoziation mit dem Zytoskelett und seiner Zellform-stabilisierenden Eigenschaft hemmt. Ferner wird im adulten ZNS zusätzlich das sogenannte VASE-Exon in der vierten FN-III ähnlichen Domäne von NCAM exprimiert, welches eine Herunterregulation des axonalen Wachstums bewirkt (Doherty *et al.*, 2000).

Durch alternatives Spleißen entsteht ebenfalls eine L1-Isoform, deren zytoplasmatische Domäne eine zusätzliche Sequenz der Aminosäureabfolge RSLE enthält. Dieses Motiv kodiert ein Endozytosignal und ermöglicht somit die Clathrin-abhängige Endozytose von L1. Hierdurch wird das L1-abhängige Neuritenwachstum reguliert (Kamiguchi *et al.*, 1998).

Für Neurofascin konnten bisher mehr als 50 verschiedene Spleißvarianten auf cDNA-Ebene identifiziert werden (Hassel *et al.*, 1997). Diese werden in unterschiedlichen Entwicklungsstadien exprimiert und besitzen unterschiedliche adhäsive Eigenschaften und Funktionen. So werden im ZNS des Huhns die zwei Neurofascin-Isoformen NF166 und NF186 entwicklungsabhängig exprimiert (Pruss *et al.*, 2006). Diese vermitteln unterschiedliche Eigenschaften hinsichtlich des Auswachsens von Hinterwurzelganglien-Neuronen (Koticha *et al.*, 2005). Die zu frühen Entwicklungszeitpunkten (E5) exprimierte Isoform NF166, der die fünfte Fibronectin-III ähnliche Domäne fehlt, stellt ein permissives Substrat für das Neuritenwachstum von Hinterwurzelganglienneuronen dar. Im Gegensatz dazu wird das Auswachsen durch die zu späteren Zeitpunkten (E9) exprimierte Isoform NF186 inhibiert. Ihre Extrazellulärdomäne enthält die fünfte Fibronectin-III ähnliche Domäne (NF+5^{te} FN-III). In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass auch während der Synaptogenese zwei unabhängige Neurofascin-Isoformen exprimiert werden, die möglicherweise unterschiedliche Funktionen besitzen. Grundlage dieser Annahme war, dass zu frühen Zeitpunkten der inhibitorischen Synaptogenese dissoziierter hippokampaler Rattenneurone eine Neurofascin-Isoform ohne die fünfte Fibronectin-III ähnliche Domäne (NF-5^{te} FN-III) exprimiert wird (Kapitel 3.3.1). Diese Isoform war verantwortlich für die Bildung von Gephyrinclustern wie sich aus der Überexpression der Neurofascin-Deletions- und Punktmutanten ergab (Kapitel 3.4 und 3.5). Des Weiteren zeigten die Ergebnisse des Neurofascin-Knockdowns sowie der Koexpression von Neurofascin und GFP-Gephyrin in Kapitel 3.6.3, 3.6.4.3 und 3.7.1, dass NF-5^{te} FN-III sogar hinreichend für die Translokation von Gephyrin an den Axonhügel ist.

Im Gegensatz dazu wurde NF186 (NF+5^{te} FN-III) am AIS reifer Neurone erst exprimiert, nachdem die Clusterbildung von Gephyrin bereits erfolgt war (16. DIV; Kapitel 3.3.1). Zudem inhibierte diese Isoform die Clusterbildung von Gephyrin in 10 DIV kultivierten hippokampalen Neuronen (Kapitel 3.3.3). Bisher wurde davon ausgegangen, dass es sich bei der axonalen Neurofascin-Isoform in der Ratte (*Rattus norvegicus*) um NF186 handelt (Ango *et al.*, 2004; Eshed *et al.*, 2005). Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse lassen jedoch den Schluß zu, dass es sich zu frühen Zeitpunkten der inhibitorischen Synaptogenese bei dem axonal exprimierten Neurofascin nicht um die Isoform NF186 handelt und diese erst zu späteren Zeitpunkten in der Entwicklung funktionell ist. Dies deutet auf unterschiedliche Funktionen der Neurofascin-Isoformen im Verlauf der inhibitorischen Synaptoge-

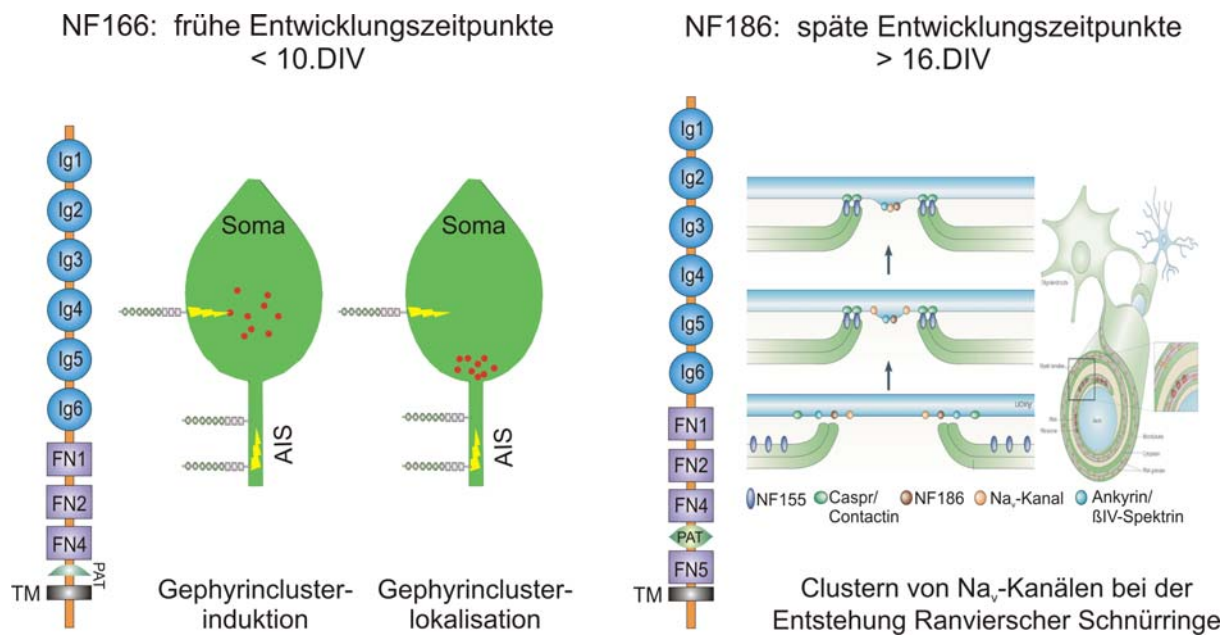


Abbildung 36 – Funktion der Neurofascin-Isoformen NF166 (NF-5^{te} FN-III) und NF186 (NF+5^{te} FN-III) während der Entwicklung. Die zu frühen Entwicklungszeitpunkten exprimierte Isoform NF-5^{te} FN-III ist verantwortlich für die Bildung von Gephyrinclustern und deren Translokation an den Axonhügel. Für die später in der Entwicklung exprimierte Isoform NF+5^{te} FN-III konnte zu späteren Entwicklungszeitpunkten bisher nur eine Beteiligung bei der Entstehung Ranvierscher Schnürringe gezeigt werden (Sherman & Brophy, 2005; Sherman *et al.*, 2005).

nese hin. Möglicherweise spielt NF+5^{te} FN-III eine Rolle bei der Reifung und Stabilisierung inhibitorischer Synapsen. Eine Beteiligung für NF+5^{te} FN-III bei diesem Prozess ist bislang jedoch unbekannt. Vielmehr wurde für NF186 eine Rolle bei der Myelinisierung und der Entstehung Ranvierscher Schnürringe gezeigt (Abbildung 36) (Sherman & Brophy, 2005; Sherman *et al.*, 2005). So ist NF186 eine entscheidende Determinante für das Clustern spannungsabhängiger Na⁺-Kanäle, AnkyrinG und βIV-Spektrin an peripheren Schnürringen (McEwen & Isom, 2004; Koticha *et al.*, 2006; Dzhashvili *et al.*, 2007).

4.4 Einfluß extrazellulärer Interaktionen auf die Entstehung von Gephyrinclustern

Durch Überexpression von NF186 bzw. der Deletionsmutante NF166-ED, welcher die zytosplasmatische Domäne fehlt, wurde der Anteil der Neurone mit Gephyrinclustern auf dem Zellkörper signifikant reduziert (Kapitel 3.3.3 und 3.4). Beide Ergebnisse deuten darauf hin, dass die extrazelluläre Domäne von Neurofascin eine wichtige Rolle für die Clusterbildung von Gephyrin spielt. CAMs können mittels ihrer extrazellulären Domäne in verschiedenen Konfigurationen miteinander wechselwirken (Kamiguchi & Lemmon, 2000). Hierbei unterscheidet man *cis*- und *trans*-Interaktionen. Bei *cis*-Wechselwirkungen befinden sich die Pro-

teine in derselben Membranebene und werden von derselben Zelle exprimiert. Eine *trans*-Interaktion ist möglich, wenn die Extrazellulärdomänen der Moleküle in zwei miteinander benachbarten Zellmembranen wechselwirken. Dabei kann es sich bei beiden Konfigurationen sowohl um homophile als auch um heterophile Interaktionen handeln. An der Synaptogenese beteiligte CAMs üben ihre Funktion meist durch Wechselwirkungen *in trans* aus. So basiert die durch Cadherine vermittelte Stabilisierung synaptischer Kontakte auf einer homophilen Interaktion dimerisierter N-Cadherin-Moleküle *in trans* (Shapiro *et al.*, 1995; Serafini, 1997; Tamura *et al.*, 1998). Auch für SynCAM ist eine homophile Wechselwirkung zwischen SynCAM-Molekülen auf der prä- und postsynaptischen Membran exzitatorischer Synapsen beschrieben (Biederer *et al.*, 2002; Breillat *et al.*, 2007). Ebenfalls stellt die heterophile β -Neurexin-Neurologin-Interaktion sowie die β -Neurexin-Dystroglycan-Interaktion eine Wechselwirkung *in trans*-Konfiguration dar (Irie *et al.*, 1997; Song *et al.*, 1999; Scheiffele *et al.*, 2000; Sugita *et al.*, 2001).

Für homophile Wechselwirkungen von Zelladhäsionsmolekülen der Ig-ähnlichen CAMs sind sowohl die *trans*- als auch die *cis*-Interaktion beschrieben (Lemmon *et al.*, 1989; De Angelis *et al.*, 1999; Kunz *et al.*, 2002). So interagiert beispielsweise L1 homophil in einer *trans*-Konfiguration. Dies begünstigt das Auswachsen von Neuriten (Lemmon *et al.*, 1989). Gleichzeitig wurde für L1 beschrieben, dass es über seine dritte FN-III ähnliche Domäne *in cis* Trimere ausbilden kann (Kiryushko *et al.*, 2004). Dadurch entsteht eine höhere Ligandenaffinität und die wachstumsfördernde Wirkung von L1 auf Neuriten wird verbessert (Hall *et al.*, 2000; Silletti *et al.*, 2000). Auch NCAM tendiert aufgrund der hohen Molekülaffinität zur Bildung von *cis*-Dimeren (Kiselyov *et al.*, 2005). Über diese erfolgt letztlich die Aktivierung des FGFR in Abhängigkeit des Polysialisierungsgrades von NCAM (Kiselyov *et al.*, 2005; Maness & Schachner, 2007). Neben homophilen Wechselwirkungen sind für L1 auch die heterophilen *cis*-Interaktionspartner TAG-1/Axonin-1, F3/F11/Contactin-1, Integrine sowie NCAM beschrieben (De Angelis *et al.*, 1999; Silletti *et al.*, 2000; Kristiansen *et al.*, 2003; Walmod *et al.*, 2004). Anhand der Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit kann nicht eindeutig ausgesagt werden, ob es sich bei der für die Gephyrincluster-Induktion verantwortlichen extrazellulären Neurofascin-Interaktion um eine *trans*- oder *cis*-Wechselwirkung handelt (Abbildung 37).

Im Falle einer *trans*-Interaktion könnte der Neurofascin-Interaktionspartner jedoch von glutamat- bzw. GABAergen präsynaptischen Terminalen stammen, die bereits am 7. DIV auf dem Soma und AIS dissoziierter hippocampaler Neurone existierten (Kapitel 3.1.3.1). Gegenwärtig ist die Identität eines exzitatorischen bzw. inhibitorischen präsynaptischen Rezeptorkandidaten jedoch nicht nachgewiesen. Verschiedene Neurofascin-Interaktionspartner wurden in der Vergangenheit identifiziert (Volkmer, 2001). Homophile Wechselwirkungen *in*

trans können ausgeschlossen werden, da Neurofascin nicht auf präsynaptischen Neuriten exprimiert wird. Es kommen deshalb ausschließlich heterophile *trans*-Interaktionen in Frage (Abbildung 37). Der Neurofascin-Interaktionspartner NrCAM kann hierbei ausgeschlossen

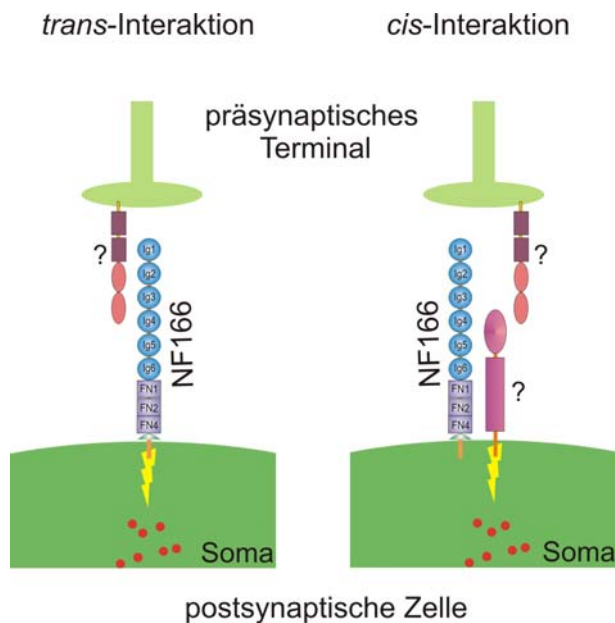


Abbildung 37 – Beispiel für eine extrazelluläre Neurofascin-Interaktion *in trans/cis*-Konfiguration. Die Gephyrincluster-Bildung könnte durch eine Wechselwirkung Neurofascins mit einem präsynaptischen Interaktionspartner *in trans* induziert werden. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Heteromerisierung Neurofascins mit einem Rezeptor *in cis*. Diese Heteromere könnten mit extrazellulären Interaktionspartnern auf präsynaptischen Terminalen *trans*-interagieren und auf diese Weise die Bildung von Gephyrinclustern auslösen.

hierbei am paranodalen Axolemma *in cis* mit Contactin. Dieser Komplex interagiert mit der von Gliazellen exprimierten Neurofascin-Isoform NF155 *in trans* und ist essentiell für die Etablierung axonaler Domänen (Charles *et al.*, 2002; Girault & Peles, 2002).

Die Bildung von Gephyrinclustern könnte auf unterschiedliche Bindungseigenschaften der beiden Isoformen NF166 und NF186 zurückzuführen sein. Es wird angenommen, dass überexprimiertes NF166-ED mit der endogenen Isoform NF-5^{te} FN-III um die Bindung extrazellulärer Interaktionspartner konkurriert. Damit könnte NF166-ED entweder mit einem NF-5^{te} FN-III Interaktionspartner *in trans* oder *in cis* wechselwirken. Aufgrund der fehlenden zytoplasmatischen Domäne von NF166-ED bleibt die Induktion von Gephyrinclustern jedoch aus. Im Gegensatz zu NF166-ED kann die extrazelluläre Domäne von NF186 durch den Besitz der fünften FN-III ähnlichen Domäne vermutlich keine kompatible Interaktion mit ei-

werden, da dieser spezifisch auf dem AIS hippocampaler Neurone lokalisiert (Dzhashvili *et al.*, 2007; Hedstrom *et al.*, 2007). Weitere potentielle Interaktionspartner Neurofascins könnten das GPI-verankerte TAG-1/Axonin-1 und F11/Contactin darstellen. Ein Hinweis für eine Beteiligung dieser Proteine fehlt bislang jedoch (Volkmer *et al.*, 1998). Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann nicht ausgeschlossen werden, dass möglicherweise homo- bzw. heterophile Neurofascin-Interaktionen *in cis* zur Induktion von Gephyrinclustern auf dem Zellkörper führen. Es ist denkbar, dass Neurofascin mit einem Rezeptor *in cis* Heteromere ausbildet, die mit einem extrazellulären Interaktionspartner auf präsynaptischen Terminalen *trans*-interagieren (Abbildung 38). Ein Beispiel für eine solche *cis-trans* Interaktion ist der paranodale Komplex der CAMs Caspr, Contactin und NF155. Caspr heterodimerisiert

nem NF-5^{te} FN-III Interaktionspartner vermitteln. Kranz (2006) zeigte beispielsweise, dass NF166 und NF186 ein unterschiedliches Bindungsverhalten gegenüber dem heterophilen Interaktionspartner Axonin-1 aufweisen. So stellt NF166 einen guten Axonin-1-Binder dar, während NF186 Axonin-1 nur schlecht bindet. Des Weiteren untersuchte Kranz (2006) die beiden Neurofascin-Isoformen im Hinblick auf ihre Funktion als Rezeptor. Bei Vorliegen einer homophilen Neurofascin-Interaktion wurden unterschiedliche Rezeptoreigenschaften der Isoformen nachgewiesen. NF166 förderte als Rezeptor das Neuritenwachstum von PC12E2-Zellen, während NF186 kein Auswachsen vermittelte. In beiden Experimenten schien der Aufbau der extrazellulären Domäne von NF186 und damit die fünfte FN-III ähnliche Domäne für die Inhibition der Wechselwirkung und das fehlende Auswachsen verantwortlich zu sein (Kranz, 2006). Die gestörte Bildung von Gephyrinclustern bei Überexpression von NF186 könnte demnach auf eine gestörte Interaktion mit einem extrazellulären NF-5^{te} FN-III Interaktionspartner *in trans* bzw. auf eine inhibierte Heteromerisierung *in cis* zurückgeführt werden.

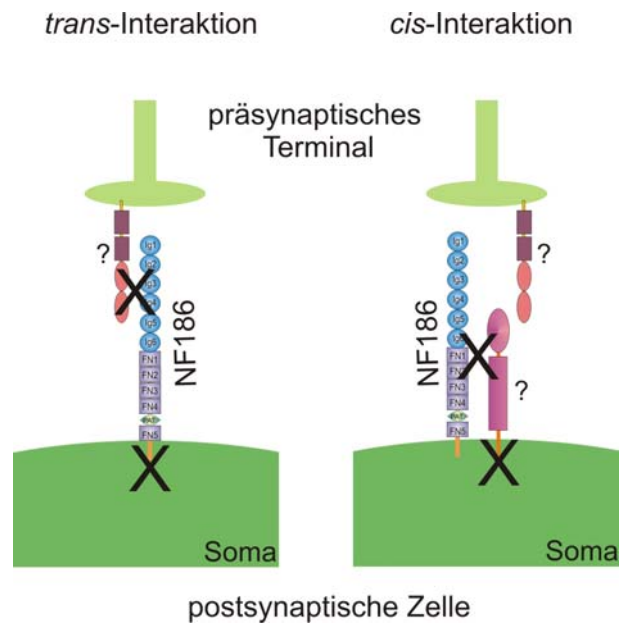


Abbildung 38– Mögliche Mechanismen, durch welche NF186 die Gephyrincluster-Bildung inhibiert. Die extrazelluläre Domäne von NF186 unterscheidet sich in ihren Bindungseigenschaften von NF166 durch den Besitz der fünften FN-III ähnlichen Domäne. NF186 kann deshalb vermutlich nicht mit einem NF-5^{te} FN-III Interaktionspartner *in trans* bzw. *in cis* wechselwirken und verhindert so die Entstehung von Gephyrinclustern.

Inwiefern präsynaptische Kontakte zur Gephyrincluster-Bildung beisteuern, ist umstritten. Kneussel & Betz (2000) gehen zwar von einem aktivitätsabhängigen Modell aus, welches die Akkumulation von Gephyrin und Glyzin- bzw. GABA_A-Rezeptoren an den entstehenden postsynaptischen Komplex beschreibt. An anderer Stelle wurde jedoch gezeigt, dass die Clusterbildung von Gephyrin und GABA_A-Rezeptoren einen von GABAergen Kontakt unabhängigen Prozess darstellt (Rao *et al.*, 2000; Brunig *et al.*, 2002; Jacob *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit befanden sich am 10. DIV sowohl glutamat- als auch GABAerge präsynaptische Komponenten auf den hippokampalen Zellkörpern. Eine Unterscheidung zwischen inhibitorischem oder exzitatorischem Input, der an der Clusterbildung Gephyrins beteiligt sein könnte, ist demnach nicht möglich. GABA hat zu diesem Zeitpunkt eine depolarisierende Wirkung und wirkt aufgrund einer verzögerten Chlorid-Transporter-Expression wie Glutamat

exzitatorisch (Ganguly *et al.*, 2001; Ben-Ari, 2002). Ein möglicher Beitrag GABAerger Aktivität für die Clusterbildung von Gephyrin könnte mit Hilfe des GABA-Antagonisten Bicucullin überprüft werden.

4.5 Untersuchung der Interaktion von Neurofascin und Gephyrin

Die Translokation von Gephyrin in subzelluläre Kompartimente wurde bislang nur für Dendriten kortikaler Neurone beschrieben (Graf *et al.*, 2004; Maas *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2007). Mechanismen, die eine Rekrutierung des inhibitorischen Gerüstproteins Gephyrin an den Axonhügel bzw. das AIS hippocampaler Neurone fördern, waren jedoch unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals Hinweise für eine Beteiligung des IgCAMs Neurofascin bei der Bildung und Translokation von Gephyrin an den Axonhügel erbracht. So war nach Neurofascin-Knockdown der Anteil an Zellen mit einer anomalen somatischen Gephyrincluster-Verteilung signifikant erhöht (Kapitel 3.6.3.2). Dieser anomale Phänotyp konnte jedoch mittels eines „Rescue“-Experimentes wiederhergestellt werden (Kapitel 3.6.4.3). Ebenfalls führte die Koexpression von GFP-Gephyrin und Neurofascin zu einer Aggregation von GFP-Gephyrin am AIS (Kapitel 3.7.1). Aufgrund dieser Ergebnisse ist ein funktioneller Zusammenhang zwischen Neurofascin und Gephyrin zu erwarten.

Ein möglicher Mechanismus der Gephyrin-Translokation durch Neurofascin könnte eine direkte Interaktion oder die Beteiligung von Neurofascin und Gephyrin in einem Proteinkomplex sein. Hierfür wäre eine Kolokalisation der beiden Proteine in Cluster zwingend notwendig. CAMs, die die Rekrutierung postsynaptischer Gerüstproteine bzw. Neurotransmitterrezeptoren über eine direkte Bindung steuern, kolokalisieren für gewöhnlich geclustert mit dem zu akkumulierenden Protein. Dies wurde beispielsweise für N-Cadherine gezeigt, welche die Rekrutierung von AMPA-Rezeptoren an die PSD exzitatorischer Synapsen veranlassen. *In vivo* bilden N-Cadherine und β -Catenine einen Proteinkomplex mit AMPA-Rezeptoren. In dissoziierten hippocampalen Neuronen kolokalisieren N-Cadherin- und AMPA-Rezeptorcluster in der PSD (Nuriya & Huganir, 2006). Ein weiteres Beispiel ist die Akkumulation von PSD-95 an der PSD exzitatorischer Synapsen durch Neuroligin. Dieses CAM ist in der Lage, über seine zytoplasmatische PDZ-Bindungsstelle die dritte PDZ-Domäne des postsynaptischen Gerüstproteins PSD-95 zu binden und anzureichern (Irie *et al.*, 1997). Auch hier wurde eine Kolokalisation von NL-1- und PSD-95-Cluster in kotransfizierten HEK293-Zellen beobachtet.

Neurofascin kann ähnlich wie Neuroligin PDZ-Proteine über sein C-terminales YSLA-Motiv binden. Auf diese Weise interagiert Neurofascin mit der zweiten PDZ-Domäne von Syntenin-1 (Koroll *et al.*, 2001). Da in inhibitorischen Postsynapsen jedoch PDZ-Domänen enthaltende Proteine fehlen und Gephyrin ebenfalls keine PDZ-Domänen besitzt, kann diese Möglichkeit ausgeschlossen werden. In HEK293 bzw. PC12E2-Zellen konnte kein Hinweis für eine Kolokalisation von Neurofascin und Gephyrinclustern gefunden werden (Kapitel 3.7.2). Mittels Immunzytochemie wurde zwar gezeigt, dass Neurofascin am 7. DIV und 10. DIV zusammen mit Gephyrinclustern am Axonhügel exprimiert wird. Die Neurofascin-Immunreaktivität war dort jedoch weder verstärkt noch geclustert. Somit war auch am Axonhügel hippocampaler Neurone keine Kolokalisation von Neurofascin mit Gephyrin zu erkennen. Im Falle einer direkten Interaktion wäre dies jedoch zu erwarten gewesen. Dass offensichtlich für die Translokation von Gephyrinclustern nicht zwangsläufig eine Kolokalisation beider Moleküle in Clustern vorliegen muss, zeigt sich am Beispiel von Collybistin. Collybistin ist ein GTP-GDP-Austauschfaktor, der im Zusammenhang mit der Gephyrin-Translokation in Dendriten beschrieben wurde (Kins *et al.*, 2000). Dieser ist in hippocampalen Neuronen gleichmäßig auf Soma und Dendriten verteilt und kolokalisiert nicht mit Gephyrinclustern auf Dendriten (Harvey *et al.*, 2004). Dennoch stellt es ein Gephyrin-Bindeprotein dar, welches Gephyrin an die postsynaptische Membran inhibitorischer Synapsen auf Dendriten rekrutiert (Kins *et al.*, 2000; Kneussel *et al.*, 2001).

Die Assoziation Neurofascins mit Zytoskelettkomponenten könnte zur Translokation von Gephyrin beitragen. Am AIS ist Ankyrin_G mit verschiedenen Komponenten wie β IV-Spektinen, spannungsabhängigen Natriumkanälen (Na_v1.6), NrCAM und Neurofascin assoziiert (Jenkins & Bennett, 2001). Interaktionen zwischen diesen Komponenten sind vermutlich essentiell für die Aufrechterhaltung der AIS-Funktion (Aravin & Tuschl, 2005; Eshed *et al.*, 2005). Bislang gibt es jedoch nur begrenzt Information über die Mechanismen, welche die Entstehung von inhibitorischem Input am AIS kontrollieren. In einer vorhergehenden Studie konnte gezeigt werden, dass ein Knockout der Ankyrin_G-Expression zu einer anomalen Lokalisation des GABAergen Inputs führt (Ango *et al.*, 2004). Diese Beobachtungen standen in einem direkten Zusammenhang mit der Neurofascin-Funktion auf der Basis kompetitiver Effekte, die durch die Überexpression der zytosolischen Domäne Neurofascins verursacht wurden. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass durch die Überexpression der analogen Neurofascin-Mutante NF166-CD die Bildung und Lokalisation von Gephyrinclustern nicht beeinträchtigt wurde. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine Neurofascin-abhängige Bildung und Translokation von Gephyrin an den Axonhügel sein, die jedoch nicht von Ankyrin_G-Interaktionen abhängt. Im Gegensatz dazu könnte die Stabilisierung synaptischer Kontakte auf einer Neurofascin-Ankyrin_G-Interaktion basieren.

4.6 Potentielle Mechanismen der Gephyrincluster-Bildung bzw. -Lokalisation durch Neurofascin-vermittelte Signaltransduktion

Signalmechanismen, durch welche eine Clusterbildung von Gephyrin und Neurotransmitterrezeptoren in Dendriten vermittelt werden kann, sind in Abbildung 39 dargestellt. Es wird an-

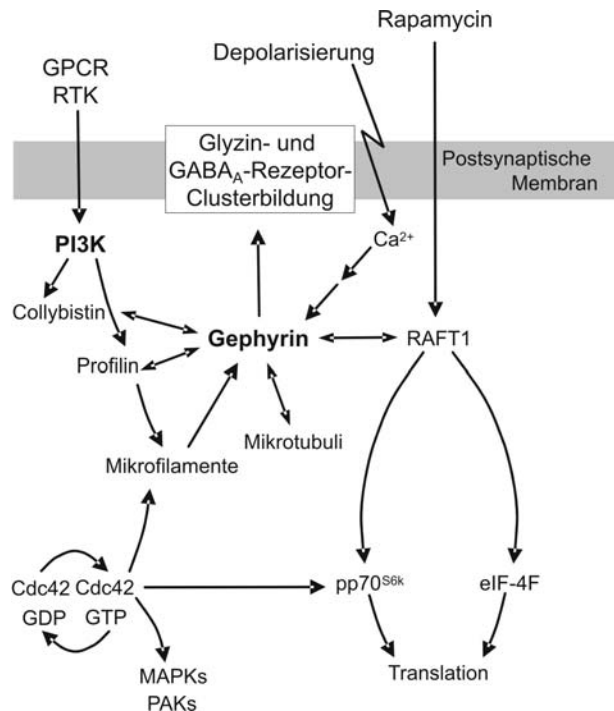


Abbildung 39 –Signalmechanismus der Clusterbildung von Gephyrin und inhibitorischen Neurotransmitterrezeptoren in Dendriten (Kneussel & Betz, 2000). Eine über RTKs- bzw. GPCRs-vermittelte lokale Aktivierung von PI3K könnte die Clusterbildung von Gephyrin an entstehenden postsynaptischen Komplexen auslösen.

verankertes Collybistin und Profilin intrazelluläres Gephyrin hin zu submembranären Mikroaggregaten. Anschließend erfolgt die Clusterbildung inhibitorischer Neurotransmitterrezeptoren.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die zytoplasmatische Domäne Neurofascins ebenso notwendig für die Entstehung von Gephyrinclustern ist wie dessen Extrazellulärdomäne. Ebenfalls wurde festgestellt, dass die Serinreste an Position 56 und 100 der zytoplasmatischen Domäne Neurofascins eine bedeutende Rolle bei der Induktion von Gephyrinclustern spielen. Kranz (2006) wies nach, dass diese Serinreste essentiell für die Neurofas-

genommen, dass sowohl der Einstrom von Ca²⁺-Ionen als auch eine lokale Aktivierung der Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K) die Ausbildung eines Gephyrin-Gerüsts an entstehenden inhibitorischen Postsynapsen auslösen kann (Kneussel & Betz, 2000). PI3K ist ein für die Synthese von Phosphatidylinositol 3,4,5-Triphosphat (Ptd Ins(3,4,5)P₃) verantwortliches Enzym und kann sowohl durch Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) als auch durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) aktiviert werden (Maier *et al.*, 1999; Ditlevsen *et al.*, 2003). Durch die resultierende Akkumulation von PtdIns(3,4,5)P₃ in der Plasmamembran werden Collybistin und Profilin an die aktivierten Membrandomänen rekrutiert. Dies führt zu einer Aktivierung der GTPase Cdc42 und zu dynamischen Veränderungen des Aktinzytoskelettes (Reid *et al.*, 1999). Des Weiteren rekrutieren PtdIns-

cin-vermittelte Neuriteninduktion in PC12E2-Zellen sind, da die oben genannten Punktmutationen das Auswachsen von Neuriten verhinderten. Es ist somit denkbar, dass diese Serinreste auch bedeutsam für die an der Induktion von Gephyrinclustern beteiligten Signaltransduktion sind. Neurofascin könnte demnach über seine zytoplasmatische Domäne eine für die Clusterbildung von Gephyrin notwendige Signalkaskade induzieren.

Als IgCAM-vermittelte Signalwege, die zu einer PI3K-Aktivierung führen und damit die Bildung von Gephyrinclustern hervorrufen könnten, kommen der FGFR- bzw. der MAPK-Signalweg in Frage (Schmid *et al.*, 1999; Neiiendam *et al.*, 2004). So ist bekannt, dass NCAM mit dem FGFR *in cis* interagieren und dessen Phosphorylierung auslösen kann (Kiselyov *et al.*, 2005; Maness & Schachner, 2007) (Abbildung 40). Dies führt zu einer anschließenden Aktivierung von PI3K durch Rekrutierung multipler Dockingproteine wie Gab1 und FAK, an welche die SH2-Domäne der p85-Untereinheit von PI3K bindet (Ditlevsen *et al.*, 2003). Für L1 wird ebenfalls eine Interaktion mit dem FGFR vermutet. Dies belegen Untersuchungen, bei denen das Auswachsen von Neuronen auf L1-Substrat durch FGFR-Antikörper oder pharmakologische Blocker beteiligter Moleküle inhibiert wurden (Doherty *et al.*, 1995; Doherty & Walsh, 1996; Bearer, 2001). Es gibt Hinweise, dass beim Neurofascin-abhängigen

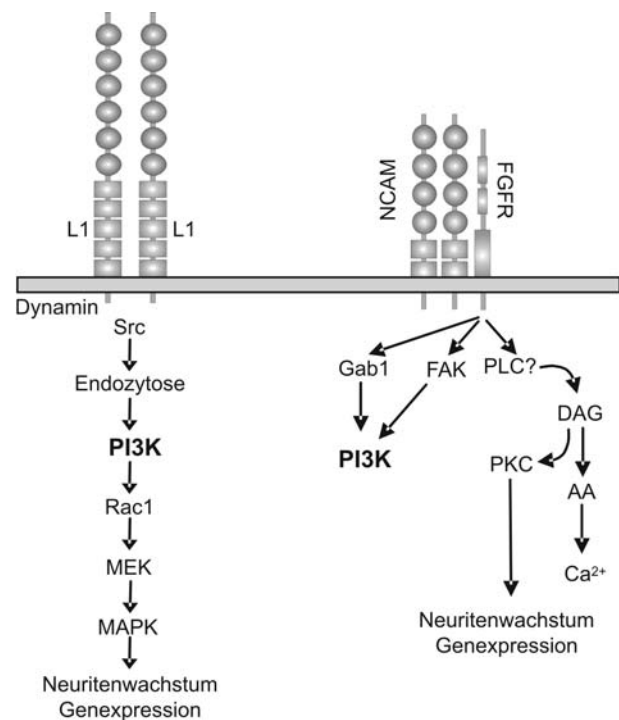


Abbildung 40 - NCAM- bzw. L1-vermittelte Signalwege, die zur Aktivierung von PI3K führen (Schmid *et al.*, 2000; Ditlevsen *et al.*, 2003).

Neuritenwachstum primärer tektaler Neurone ebenfalls der FGFR-Signalweg beteiligt ist (Kirschbaum *et al.*, 2006; Kranz, 2006). Es ist daher denkbar, dass die Clusterbildung von Gephyrin im Soma hippocampaler Neurone über eine heterophile Interaktion von Neurofascin mit dem FGFR *in cis* und die Aktivierung von PI3K induziert werden könnte. Eine Interaktion von Neurofascin mit dem FGFR muss jedoch noch nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde der dargestellte FGFR-Signalweg im Zusammenhang mit dem Neuritenwachstum sowie dem Überleben neuronaler Zellen beschrieben (Ditlevsen *et al.*, 2003; Neiiendam *et al.*, 2004). Ob dieser auch bei der Clusterbildung bzw. -lokalisierung von Gephyrin beteiligt ist, muss überprüft werden. Bekannt ist jedoch, dass die exzitatorische Synaptogenese über den FGFR reguliert werden kann. So wurde durch Einsatz des NCAM-

Peptidmimetikums FGL, welches an den FGFR bindet, die Anzahl exzitatorischer Synapsen in dissoziierten hippokampalen Neuronen erhöht (Cambon *et al.*, 2004).

Ebenfalls ist der durch L1 vermittelte MAPK-Signalweg mit einer Aktivierung von PI3K verbunden (Kolkova *et al.*, 2000). Hierbei wird angenommen, dass eine homophile L1-Interaktion die Src-Tyrosinkinase induziert (Abbildung 40). Dies führt zur Initiierung einer intrazellulären Signalkaskade, bei der eine stufenweise Aktivierung von PI3K, Rac, MEK und MAPK stattfindet (Schmid *et al.*, 2000). Neurofascin könnte als Mitglied der L1-Unterfamilie ebenfalls den MAPK-Signalweg induzieren. Dies kann anhand des Neurofascin-Punktmutanten Experimentes vermutet werden. Somit könnte eine durch Neurofascin vermittelte Aktivierung des MAPK-Signalweges und eine damit verbundene Aktivierung von PI3K die Induktion bzw. Translokation von Gephyrinclustern ermöglichen. Ob jedoch der MAPK-Signalweg bei der Clusterbildung von Gephyrin eine Rolle spielt, ist unklar. Des Weiteren sollte zunächst eine Beteiligung von Neurofascin im MAPK-Signalweg gezeigt werden, um diese Annahme zu verifizieren.

PtdIns-verankertes Collybistin scheint zwar ebenfalls bei der Rekrutierung Gephyrins an den inhibitorischen postsynaptischen Komplex beteiligt zu sein. Gemäß des Membranaktivierungsmodells von Kneussel & Betz (2000) erfolgt die Collybistin-Rekrutierung an die Plasmamembran mit nachgeschalteter Aktivierung von Cdc42 jedoch erst nach einer Aktivierung von PI3K (Abbildung 39). Sollte Neurofascin über einen der beiden genannten Signalwege eine PI3K-Aktivierung auslösen, könnte dies bedeuten, dass die durch Collybistin aktivierte Signalkaskade mit anschließender submembranärer Gephyrintranslokation Neurofascin nachgeschaltet ist. Auch diese Hypothese bedarf einer weiteren Aufklärung des Neurofascin-vermittelten Signalweges.

4.7 Ausblick

Bisher war wenig zur Rolle von CAMs bei der inhibitorischen Synaptogenese bekannt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das IgCAM Neurofascin zu frühen Entwicklungszeitpunkten die Entstehung und Lokalisation von Gephyrin reguliert. Hierdurch wurde ein Beitrag zur Klärung des funktionellen Zusammenhanges zwischen CAMs und inhibitorischen postsynaptischen Gerüstproteinen geleistet.

Aufklärungsbedarf besteht in der Identifikation möglicher Interaktionspartner Neurofascins, die offensichtlich für die Gephyrincluster-Bildung notwendig sind. Hierzu könnten Antikörper-

perturbationassays bzw. die Zugabe löslicher IgFc-Fusionsproteine gegen potentielle Interaktionspartner beitragen.

Ebenfalls bedarf die Interaktion zwischen Neurofascin und Gephyrin näherer Untersuchungen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern keinen Hinweis auf direkte Interaktionen. Es bleibt deshalb zu klären, welche Adaptermoleküle und neuronalen Komponenten zusätzlich notwendig sind, um Gephyrincluster an den Axonhügel zu translozieren. Des Weiteren ist die Analyse Neurofascin-vermittelter Signalwege, die zur Induktion und Translokation von Gephyrinclustern an den Axonhügel führen, notwendig. Dies könnte mit Hilfe von Inhibitoren gegen bestimmte im FGFR- bzw. MAPK-Signalweg involvierte Signalmoleküle wie beispielsweise PI3K gelingen.

Zusätzlich bleibt im Hinblick auf reife Synapsen zu klären, wie sich eine anomale Gephyrincluster-Lokalisation nach Neurofascin-Knockdown bzw. eine fehlende Gephyrincluster-Bildung auf die Lokalisation von GABA_A-Rezeptoren und auf die Funktion reifer Pyramidenneurone auswirkt. So besitzen hippocampale Kulturen Gephyrin-defizienter Mäuse weniger als 3 % GABA_A-Rezeptoren des $\alpha 2/\gamma 2$ -Subtyps (Essrich *et al.*, 1998; Kneussel *et al.*, 1999). Um einen Zusammenhang zwischen der Neurofascin-Funktion und der GABA_A-Rezeptor-Lokalisation untersuchen zu können, sind weitere immunzytochemische bzw. elektrophysiologische Untersuchungen hippocampaler Neuronenkulturen mit reifen inhibitorischen Synapsen sinnvoll.

5 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt PD Dr. Hansjürgen Volkmer, für die Überlassung des interessanten Themas und die hervorragende Unterstützung. Ich habe ihn als engagierten Diskussionspartner kennen und schätzen gelernt, wodurch er maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat. Herrn Prof. Dr. Harald Rösner danke ich für seine Bereitschaft, meine Doktorarbeit zu begutachten.

Bei Herrn Prof. Dr. Michael Kiebler und Dr. Bernhard Goetze vom Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen bedanke ich mich ganz besonders für die Unterstützung bei der Etablierung der hippokampalen Neuronenkultur.

Der erfolgreiche Abschluss meiner Doktorarbeit wäre ohne die Unterstützung meiner Kollegen aus der Abteilung Molekularbiologie nicht möglich gewesen. Deshalb danke ich Dr. Martin Kriebel, Dr. Angelika Öhmig und Dr. Frank Weise sowie Ursula Hagner, Roswitha Fischer, Sibylle Glock und Thomas Hees für die sehr gute Arbeitsatmosphäre, Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft.

Mein herzlicher Dank gilt auch Anette Kirn, Stefanie Radziwill und Sabine Trinks sowie den ehemaligen Doktoranden Eva Kranz und Andreas Maurer für ihre Unterstützung vor allem zu Anfang der Doktorarbeit. Beide hatten stets ein offenes Ohr für mich, ganz zu Schweigen von ihrem unermesslichen Repertoire an Lösungsansätzen. Außerdem möchte ich mich bei Thoralf Herrman bedanken, der als Systemadministrator des 3. Stockwerkes Nervenstärke in PC-Angelegenheiten bewiesen hat.

Schließlich möchte ich dem ganzen NMI und seinen Mitarbeitern für die schöne Zeit während der Erstellung dieser Arbeit danken. Nicht nur wegen der fachlichen Unterstützung, sondern auch wegen des hervorragenden Betriebsklimas wird mir diese Zeit immer in sehr guter Erinnerung bleiben.

Das größte Dankeschön geht jedoch an meinen Freund Niki, der mit mir durch alle Hoch- und Tiefphasen dieser Zeit gegangen ist sowie meiner Mutter, die stets an mich glaubte.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
A	Ampere
AIS	A xoninitialsegment
Amp	Ampicilin
AMPA	α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-isooxylpropionsäure
ANOVA	A nalysis of V ariance
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
CAM	Zelladhäsionsmolekül
CD	Cytoplasmatische Domäne
cDNA	“complementary” DNA
CMV	Zytomegalovirus
Cy2 TM	Carbocyanin
Cy3 TM	Indocarbocyanin
d	Tag(e)
Da	Dalton
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DIV	Days <i>in vitro</i> = Kultivierungstag
DMEM	D ulbecco's m odified e agle m edium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	D esoxynukleosidtriphosphat
DTT	D ithiothreitol
E17	Embryonaltag 17
ECM	extrazelluläre Matrix
ED	Extrazelluläre Domäne
EDTA	E thylendiamintetraacetat
ERK	E xtracellular signal- R egulated K inase
Fab	Antigen bindendes Fragment eines Antikörpers
FCS	Fötale Kälberserum
FGFR	F ibroblast G rowth F actor R eceptor
FNIII	F ibronectin Typ I II ähnliche Domäne
g	Gramm
g	Gravitationskonstante (g=9,81 m/s ²)
GABA	γ-Aminobuttersäure
GABA _A -R	γ-Aminobuttersäure Typ A Rezeptor
GABA _A -RAP	GABA _A -Rezeptor assoziiertes Protein
GAD	G lutamat D ehydrogenase
GAPDH	G lycerinaldehydphosphat D ehydrogenase
GEF	G uanine nucleotide E xchange F actor
GFP	e nanced G reen F luorescent P rotein – verstärkt grün fluoreszierendes Protein
GPI	G lykosylphosphatidylinositol
h	Stunde(n)
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HS	Pferdeserum
IgCAMs	I mmunglobulin-ähnliche Domänen enthaltende Zelladhäsionsmoleküle
IgSF	I mmunglobulinsuperfamilie

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Kan	Kanamycin
m	Milli (10^{-3})
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MEM	Minimal Essential Medium
mRNA	Messenger RNA
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
NgCAM	Neuron-Glia Cell Adhesion Molecule
NMDA	N-methyl-D-aspartat
NrCAM	NgCAM-related Cell Adhesion Molecule
OD ₆₀₀	Optische Dichte gemessen bei der Wellenlänge $\lambda=600$
P3	Postnataltag 3
PAT	Prolin-Alanin-Threoninreiche Domäne
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDZ	PSD95 (post synaptic density protein) DlgA (Drosophila disc large tumor suppressor) ZO1 Domäne (auch DHR (Dlg homologous region) oder GLGF
PFA	Paraformaldehyd
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosum</i>
PLL	Poly-L-Lysin
PSD	Post Synaptic Density
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
shRNA	short Hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
TE	Tris / EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetrazyklin
TM	Transmembrandomäne
U	Unit(s)
V	Volt
VGlut	Vesikulärer Glutamat-Transporter
ZNS	Zentrales Nervensystem

7 PUBLIKATIONEN

Während dieser Doktorarbeit wurden angefertigt:

7.1 Publikationen

Burkarth, N., Kriebel, M., Kranz E.U. & Volkmer, H. (2007) Neurofascin regulates the formation of Gephyrin clusters and their subsequent translocation to the axon hillock of hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci.* 2007; 36(1):59-70.

Hansen, K.H., Christensen, C., Korshunova, I., Kriebel, M., Burkarth, N., Kiselyov, V.V., Olesen, M., Ostergaard, S., Holm, A., Volkmer, H., Walmod, P.S., Berezin, V. & Bock, E. Identification of NCAM-binding peptides promoting neurite outgrowth via a heterotrimeric G-protein-coupled pathway. *J Neurochem.* 2007; 103(4):1396-407

7.2 Kongressbeiträge

Volkmer, H., Burkarth, N. & Kriebel, M. Neurofascin regulates the formation of Gephyrin clusters and their subsequent translocation to the axon hillock of hippocampal neurons. 37th annual meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, USA, 2007.

Burkarth, N., Kriebel, M. & Volkmer, H. Neurofascin regulates the formation of Gephyrin clusters and their subsequent translocation to the axon hillock of hippocampal neurons. 2nd Meeting Promemoria, Bad Lauterberg, 2007

Burkarth, N., Kriebel, M., Pruss, T., Kranz E.U. & Volkmer, H. Motility and contact stabilisation in the developing nervous system are regulated by developmentally expressed neurofascin isoforms. 5th Forum of the European Neuroscience Society (FENS), Wien, 2006

8 LITERATURVERZEICHNIS

Akins M R; Biederer T (2006). Cell-cell interactions in synaptogenesis. *Curr Opin Neurobiol*, **16** (1), 83-9

Alberts B, et al. (1995). Zell-Zell-Adhäsion, Zellverbindungen und die extrazelluläre Matrix. In: *Molekularbiologie der Zelle*, pp 946-993, Weinheim

Allison D W, et al. (2000). Postsynaptic scaffolds of excitatory and inhibitory synapses in hippocampal neurons: Maintenance of core components independent of actin filaments and microtubules. *Journal of Neuroscience*, **20** (12), 4545-4554

Anderson T R, et al. (2004). Maturation of glutamatergic and GABAergic synapse composition in hippocampal neurons. *Neuropharmacology*, **47** (5), 694-705

Ango F, et al. (2004). Ankyrin-based subcellular gradient of neurofascin, an immunoglobulin family protein, directs GABAergic innervation at purkinje axon initial segment. *Cell*, **119** (2), 257-72

Aplin A E, et al. (1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev*, **50** (2), 197-263

Aravin A; Tuschl T (2005). Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing. *FEBS Letters*, **579** (26), 5830-5840

Barbas J A, et al. (1988). Differential splicing and alternative polyadenylation generates distinct NCAM transcripts and proteins in the mouse. *Embo J*, **7** (3), 625-32

Bearer C F (2001). L1 cell adhesion molecule signal cascades: targets for ethanol developmental neurotoxicity. *Neurotoxicology*, **22** (5), 625-33

Ben-Ari Y (2002). Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci*, **3** (9), 728-39

Benson D L, et al. (1994). Characterization of GABAergic neurons in hippocampal cell cultures. *Journal of Neurocytology*, **23** (5), 279-295

Benson D L; Cohen P A (1996). Activity-independent segregation of excitatory and inhibitory synaptic terminals in cultured hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*, **16** (20), 6424-6432

Benson D L, et al. (1996). Compartmentation of alpha-internexin and neurofilament triplet proteins in cultured hippocampal neurons. *J Neurocytol*, **25** (3), 181-96

Benson D L; Tanaka H (1998). N-cadherin redistribution during synaptogenesis in hippocampal neurons. *J Neurosci*, **18** (17), 6892-904

Biederer T, et al. (2002). SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly. *Science*, **297** (5586), 1525-1531

Bozdagi O, et al. (2004). Temporally distinct demands for classic cadherins in synapse formation and maturation. *Mol Cell Neurosci*, **27** (4), 509-21

- Breillat C, et al.** (2007). Characterization of SynCAM surface trafficking using a SynCAM derived ligand with high homophilic binding affinity. *Biochem Biophys Res Commun*, **359** (3), 655-9
- Brose N** (1999). Synaptic cell adhesion proteins and synaptogenesis in the mammalian central nervous system. *Naturwissenschaften*, **86** (11), 516-524
- Brümmendorf T; Rathjen F G** (1993). Axonal glycoproteins with immunoglobulin- and fibronectin type III-related domains in vertebrates: structural features, binding activities, and signal transduction. *J Neurochem*, **61** (4), 1207-19
- Brunig I, et al.** (2002). GABAergic terminals are required for postsynaptic clustering of dystrophin but not of GABA(A) receptors and gephyrin. *J Neurosci*, **22** (12), 4805-13
- Büttner B, et al.** (2004). Cytoplasmic domain of NCAM 180 reduces NCAM-mediated neurite outgrowth. *J Neurosci Res*, **75** (6), 854-60
- Bukalo O, et al.** (2004). Conditional ablation of the neural cell adhesion molecule reduces precision of spatial learning, long-term potentiation, and depression in the CA1 subfield of mouse hippocampus. *J Neurosci*, **24** (7), 1565-77
- Caceres A, et al.** (1984). MAP2 is localized to the dendrites of hippocampal neurons which develop in culture. *Brain Res*, **315** (2), 314-8
- Cambon K, et al.** (2004). A synthetic neural cell adhesion molecule mimetic peptide promotes synaptogenesis, enhances presynaptic function, and facilitates memory consolidation. *J Neurosci*, **24** (17), 4197-204
- Charles P, et al.** (2000). Negative regulation of central nervous system myelination by polysialylated-neural cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97** (13), 7585-90
- Charles P, et al.** (2002). Neurofascin is a glial receptor for the paranodin/Caspr-contactin axonal complex at the axoglial junction. *Curr Biol*, **12** (3), 217-20
- Chavis P; Westbrook G** (2001). Integrins mediate functional pre- and postsynaptic maturation at a hippocampal synapse. *Nature*, **411** (6835), 317-21
- Chiba A; Keshishian H** (1996). Neuronal pathfinding and recognition: roles of cell adhesion molecules. *Dev Biol*, **180** (2), 424-32
- Chih B, et al.** (2005). Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. *Science*, **307** (5713), 1324-8
- Chothia C, et al.** (1998). Structural determinants in the sequences of immunoglobulin variable domain. *J Mol Biol*, **278** (2), 457-79
- Christie S B; De Blas A L** (2003). GABAergic and glutamatergic axons innervate the axon initial segment and organize GABAA receptor clusters of cultured hippocampal pyramidal cells. *Journal of Comparative Neurology*, **456** (4), 361-374
- Colledge M, et al.** (2003). Ubiquitination regulates PSD-95 degradation and AMPA receptor surface expression. *Neuron*, **40** (3), 595-607
- Collins M O, et al.** (2006). Molecular characterization and comparison of the components and multiprotein complexes in the postsynaptic proteome. *J Neurochem*, **97 Suppl 1**, 16-23

- Collinson J M, et al.** (1998). Transient expression of neurofascin by oligodendrocytes at the onset of myelinogenesis: Implications for mechanisms of axon-glia interaction. *GLIA*, **23** (1), 11-23
- Craig A M; Banker G** (1994). Neuronal polarity. *Annu Rev Neurosci*, **17**, 267-310
- Craig A M, et al.** (1994). Selective clustering of glutamate and gamma-aminobutyric acid receptors opposite terminals releasing the corresponding neurotransmitters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91** (26), 12373-7
- Craig A M, et al.** (1996). Clustering of gephyrin at GABAergic but not glutamatergic synapses in cultured rat hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*, **16** (10), 3166-3177
- Craig A M, et al.** (2006). How to build a central synapse: Clues from cell culture. *Trends in Neurosciences*, **29** (1), 8-20
- Dalva M B, et al.** (2007). Cell adhesion molecules: signalling functions at the synapse. *Nat Rev Neurosci*, **8** (3), 206-20
- Danglot L, et al.** (2003). Association of gephyrin with synaptic and extrasynaptic GABAA receptors varies during development in cultured hippocampal neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*, **23** (2), 264-278
- Davis J Q; Bennett V** (1994). Ankyrin binding activity shared by the neurofascin/L1/NrCAM family of nervous system cell adhesion molecules. *J Biol Chem*, **269** (44), 27163-6
- De Angelis E, et al.** (1999). Pathological missense mutations of neural cell adhesion molecule L1 affect homophilic and heterophilic binding activities. *Embo J*, **18** (17), 4744-53
- Dean C, et al.** (2003). Neurexin mediates the assembly of presynaptic terminals. *Nature Neuroscience*, **6** (7), 708-716
- Dean C; Dresbach T** (2006). Neuroligins and neurexins: linking cell adhesion, synapse formation and cognitive function. *Trends Neurosci*, **29** (1), 21-9
- Di Cristo G, et al.** (2004). Subcellular domain-restricted GABAergic innervation in primary visual cortex in the absence of sensory and thalamic inputs. *Nat Neurosci*, **7** (11), 1184-6
- Ditlevsen D K, et al.** (2003). The role of phosphatidylinositol 3-kinase in neural cell adhesion molecule-mediated neuronal differentiation and survival. *J Neurochem*, **84** (3), 546-56
- Dityatev A, et al.** (2000). Synaptic strength as a function of post- versus presynaptic expression of the neural cell adhesion molecule NCAM. *Neuron*, **26** (1), 207-217
- Doherty P, et al.** (1995). A soluble chimeric form of the L1 glycoprotein stimulates neurite outgrowth. *Neuron*, **14** (1), 57-66
- Doherty P; Walsh F S** (1996). CAM-FGF Receptor Interactions: A Model for Axonal Growth. *Mol Cell Neurosci*, **8** (2/3), 99-111
- Doherty P, et al.** (2000). CAMs and axonal growth: a critical evaluation of the role of calcium and the MAPK cascade. *Mol Cell Neurosci*, **16** (4), 283-95
- Dotti C G, et al.** (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci*, **8** (4), 1454-68

- Dzhashiashvili Y, et al.** (2007). Nodes of Ranvier and axon initial segments are ankyrin G-dependent domains that assemble by distinct mechanisms. *J Cell Biol*, **177** (5), 857-70
- Edelman G M** (1987). CAMs and Igs: cell adhesion and the evolutionary origins of immunity. *Immunol Rev*, **100**, 11-45
- El-Husseini A E, et al.** (2000). PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science*, **290** (5495), 1364-8
- Eshed Y, et al.** (2005). Gliomedin mediates Schwann cell-axon interaction and the molecular assembly of the nodes of Ranvier. *Neuron*, **47** (2), 215-229
- Essrich C, et al.** (1998). Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nat Neurosci*, **1** (7), 563-71
- Fletcher T L, et al.** (1994). Synaptogenesis in hippocampal cultures: Evidence indicating that axons and dendrites become competent to form synapses at different stages of neuronal development. *Journal of Neuroscience*, **14** (11 I), 6695-6706
- Fritschy J M, et al.** (2003). Pre- and post-synaptic mechanisms regulating the clustering of type A γ -aminobutyric acid receptors (GABAA receptors). *Biochemical Society Transactions*, **31** (4), 889-892
- Ganguly K, et al.** (2001). GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell*, **105** (4), 521-32
- Garner C C, et al.** (2000). PDZ domains in synapse assembly and signalling. *Trends Cell Biol*, **10** (7), 274-80
- Garver T D, et al.** (1997). Tyrosine phosphorylation at a site highly conserved in the L1 family of cell adhesion molecules abolishes ankyrin binding and increases lateral mobility of neurofascin. *J Cell Biol*, **137** (3), 703-14
- Gerrow K; El-Husseini A** (2006). Cell adhesion molecules at the synapse. *Frontiers in Bioscience*, **11** (SUPPL. 2), 2400-2419
- Giesemann T, et al.** (2003). Complex formation between the postsynaptic scaffolding protein gephyrin, profilin, and Mena: A possible link to the microfilament system. *Journal of Neuroscience*, **23** (23), 8330-8339
- Girault J A; Peles E** (2002). Development of nodes of Ranvier. *Curr Opin Neurobiol*, **12** (5), 476-85
- Goda Y; Davis G W** (2003). Mechanisms of synapse assembly and disassembly. *Neuron*, **40** (2), 243-264
- Goetze B, et al.** (2006). The brain-specific double-stranded RNA-binding protein Staufen2 is required for dendritic spine morphogenesis. *Journal of Cell Biology*, **172** (2), 221-231
- Gomperts S N, et al.** (2000). Distinct roles for ionotropic and metabotropic glutamate receptors in the maturation of excitatory synapses. *J Neurosci*, **20** (6), 2229-37
- Goodman C S** (1996). Mechanisms and molecules that control growth cone guidance. *Annu Rev Neurosci*, **19**, 341-77

- Goslin K; Banker G** (1998). Rat hippocampal neurons in low-density culture In: *Culturing Nerve Cells*
pp 339-370, Cambridge, MA
- Graf E R, et al.** (2004). Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins. *Cell*, **119** (7), 1013-26
- Hall H, et al.** (2000). Trimerization of cell adhesion molecule L1 mimics clustered L1 expression on the cell surface: influence on L1-ligand interactions and on promotion of neurite outgrowth. *J Neurochem*, **75** (1), 336-46
- Harvey K, et al.** (2004). The GDP-GTP exchange factor collybistin: An essential determinant of neuronal gephyrin clustering. *Journal of Neuroscience*, **24** (25), 5816-5826
- Hassel B, et al.** (1997). Organization of the neurofascin gene and analysis of developmentally regulated alternative splicing. *Journal of Biological Chemistry*, **272** (45), 28742-28749
- Hedstrom K L, et al.** (2007). Neurofascin assembles a specialized extracellular matrix at the axon initial segment. *J Cell Biol*, **178** (5), 875-86
- Hirbec H, et al.** (2005). Syntenin is involved in the developmental regulation of neuronal membrane architecture. *Mol Cell Neurosci*, **28** (4), 737-46
- Hyman S E** (2005). Neurotransmitters. *Curr Biol*, **15** (5), R154-8
- Hynes R O** (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, **69** (1), 11-25
- Inda M C, et al.** (2006). Voltage-gated ion channels in the axon initial segment of human cortical pyramidal cells and their relationship with chandelier cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103** (8), 2920-5
- Inda M C, et al.** (2007). The distribution of chandelier cell axon terminals that express the GABA plasma membrane transporter GAT-1 in the human neocortex. *Cereb Cortex*, **17** (9), 2060-71
- Irie M, et al.** (1997). Binding of neuroligins to PSD-95. *Science*, **277** (5331), 1511-5
- Isaacson J S** (2000). Spillover in the spotlight. *Curr Biol*, **10** (13), R475-7
- Jacob T C, et al.** (2005). Gephyrin regulates the cell surface dynamics of synaptic GABA_A receptors. *Journal of Neuroscience*, **25** (45), 10469-10478
- Jenkins S M; Bennett V** (2001). Ankyrin-G coordinates assembly of the spectrin-based membrane skeleton, voltage-gated sodium channels, and L1 CAMs at Purkinje neuron initial segments. *Journal of Cell Biology*, **155** (5), 739-745
- Jentoft N** (1990). Why are proteins O-glycosylated? *Trends Biochem Sci*, **15** (8), 291-4
- Kamiguchi H, et al.** (1998). The neural cell adhesion molecule L1 interacts with the AP-2 adaptor and is endocytosed via the clathrin-mediated pathway. *J Neurosci*, **18** (14), 5311-21
- Kamiguchi H; Lemmon V** (2000). IgCAMs: bidirectional signals underlying neurite growth. *Curr Opin Cell Biol*, **12** (5), 598-605

- Kandel E R, et al.** (1996). Neurowissenschaften. Spektrum Verlag, Heidelberg
- Kang Y, et al.** (2007). Induction of gabaergic postsynaptic differentiation by alpha -neurexins. *J Biol Chem*,
- Kennedy M B** (1997). The postsynaptic density at glutamatergic synapses. *Trends Neurosci*, **20** (6), 264-8
- Kim E; Sheng M** (2004). PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci*, **5** (10), 771-81
- Kim J H, et al.** (1998). SynGAP: a synaptic RasGAP that associates with the PSD-95/SAP90 protein family. *Neuron*, **20** (4), 683-91
- Kins S, et al.** (2000). Collybistin, a newly identified brain-specific GEF, induces submembrane clustering of gephyrin. *Nat Neurosci*, **3** (1), 22-9
- Kirschbaum K, et al.** (2006). Homophilic interactions of neurofascin induce neurite outgrowth via MAP kinase and FGF receptor-PLC-gamma signalling pathways. FENS Forum 2006, Wien, Österreich, pp. A228.8
- Kiryushko D, et al.** (2004). Regulators of neurite outgrowth: role of cell adhesion molecules. *Ann N Y Acad Sci*, **1014**, 140-54
- Kiselyov V V, et al.** (2005). Structural biology of NCAM homophilic binding and activation of FGFR. *J Neurochem*, **94** (5), 1169-79
- Kneussel M, et al.** (1999). Loss of postsynaptic GABA(A) receptor clustering in gephyrin-deficient mice. *J Neurosci*, **19** (21), 9289-97
- Kneussel M; Betz H** (2000). Receptors, gephyrin and gephyrin-associated proteins: Novel insights into the assembly of inhibitory postsynaptic membrane specializations. *Journal of Physiology*, **525** (1), 1-9
- Kneussel M; Betz H** (2000). Clustering of inhibitory neurotransmitter receptors at developing postsynaptic sites: the membrane activation model. *Trends Neurosci*, **23** (9), 429-35
- Kneussel M, et al.** (2001). Distribution of transcripts for the brain-specific GDP/GTP exchange factor collybistin in the developing mouse brain. *Eur J Neurosci*, **13** (3), 487-92
- Kolkova K, et al.** (2000). Neural cell adhesion molecule-stimulated neurite outgrowth depends on activation of protein kinase C and the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci*, **20** (6), 2238-46
- Kordeli E, et al.** (1995). AnkyrinG. A new ankyrin gene with neural-specific isoforms localized at the axonal initial segment and node of Ranvier. *J Biol Chem*, **270** (5), 2352-9
- Koroll M, et al.** (2001). The Neural Cell Recognition Molecule Neurofascin Interacts with Syntenin-1 but Not with Syntenin-2, Both of Which Reveal Self-associating Activity. *Journal of Biological Chemistry*, **276** (14), 10646-10654
- Koticha D, et al.** (2005). Cell adhesion and neurite outgrowth are promoted by neurofascin NF155 and inhibited by NF186. *Mol Cell Neurosci*, **30** (1), 137-48

Koticha D, et al. (2006). Neurofascin interactions play a critical role in clustering sodium channels, ankyrin G and beta IV spectrin at peripheral nodes of Ranvier. *Dev Biol*, **293** (1), 1-12

Kranz E U (2006). Bedeutung des Domänenaufbaus von Neurofascin für das Neuritenwachstum Der Andere Verlag,

Kristiansen G, et al. (2003). Expression of the cell adhesion molecule CD146/MCAM in non-small cell lung cancer. *Anal Cell Pathol*, **25** (2), 77-81

Kunz B, et al. (2002). Axonin-1/TAG-1 mediates cell-cell adhesion by a cis-assisted trans-interaction. *J Biol Chem*, **277** (6), 4551-7

Lardi-Studler B; Fritschy J M (2007). Reviews: Matching of pre- and postsynaptic specializations during synaptogenesis. *Neuroscientist*, **13** (2), 115-126

Lee S H; Sheng M (2000). Development of neuron-neuron synapses. *Curr Opin Neurobiol*, **10** (1), 125-31

Lemmon V, et al. (1989). L1-mediated axon outgrowth occurs via a homophilic binding mechanism. *Neuron*, **2** (6), 1597-603

Levi S, et al. (2002). Dystroglycan is selectively associated with inhibitory GABAergic synapses but is dispensable for their differentiation. *J Neurosci*, **22** (11), 4274-85

Levi S, et al. (2004). Gephyrin is critical for glycine receptor clustering but not for the formation of functional GABAergic synapses in hippocampal neurons. *J Neurosci*, **24** (1), 207-17

Levinson J N, et al. (2005). Neuroligins mediate excitatory and inhibitory synapse formation: involvement of PSD-95 and neurexin-1beta in neuroligin-induced synaptic specificity. *J Biol Chem*, **280** (17), 17312-9

Lise M F; El-Husseini A (2006). The neuroligin and neurexin families: from structure to function at the synapse. *Cell Mol Life Sci*, **63** (16), 1833-49

Lowenstein P R, et al. (1995). Synaptogenesis and distribution of presynaptic axonal varicosities in low density primary cultures of neocortex: an immunocytochemical study utilizing synaptic vesicle-specific antibodies, and an electrophysiological examination utilizing whole cell recording. *J Neurocytol*, **24** (4), 301-17

Maas C, et al. (2006). Neuronal cotransport of glycine receptor and the scaffold protein gephyrin. *Journal of Cell Biology*, **172** (3), 441-451

Maier U, et al. (1999). Roles of non-catalytic subunits in gbetagamma-induced activation of class I phosphoinositide 3-kinase isoforms beta and gamma. *J Biol Chem*, **274** (41), 29311-7

Malosio M L, et al. (1991). Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain. *Embo J*, **10** (9), 2401-9

Maness P F; Schachner M (2007). Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat Neurosci*, **10** (1), 19-26

Mangan P S, et al. (2005). Cultured hippocampal pyramidal neurons express two kinds of GABA A receptors. *Molecular Pharmacology*, **67** (3), 775-788

- Mattson M P** (1999). Establishment and plasticity of neuronal polarity. *J Neurosci Res*, **57** (5), 577-89
- McEwen D P; Isom L L** (2004). Heterophilic interactions of sodium channel beta1 subunits with axonal and glial cell adhesion molecules. *J Biol Chem*, **279** (50), 52744-52
- Missler M; Sudhof T C** (1998). Neurexins: three genes and 1001 products. *Trends Genet*, **14** (1), 20-6
- Mullen R J, et al.** (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, **116** (1), 201-11
- Murray B A, et al.** (1986). Alternatively spliced mRNAs code for different polypeptide chains of the chicken neural cell adhesion molecule (N-CAM). *J Cell Biol*, **102** (1), 189-93
- Nam C I; Chen L** (2005). Postsynaptic assembly induced by neurexin-neuroigin interaction and neurotransmitter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102** (17), 6137-42
- Neiiendam J L, et al.** (2004). An NCAM-derived FGF-receptor agonist, the FGL-peptide, induces neurite outgrowth and neuronal survival in primary rat neurons. *J Neurochem*, **91** (4), 920-35
- Nourry C, et al.** (2003). PDZ domain proteins: plug and play! *Sci STKE*, **2003** (179), RE7
- Nuriya M; Haganir R L** (2006). Regulation of AMPA receptor trafficking by N-cadherin. *J Neurochem*, **97** (3), 652-61
- Persohn E; Schachner M** (1990). Immunohistological localization of the neural adhesion molecules L1 and N-CAM in the developing hippocampus of the mouse. *J Neurocytol*, **19** (6), 807-19
- Pfeiffer F, et al.** (1982). Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord. *J Biol Chem*, **257** (16), 9389-93
- Pollerberg G E, et al.** (1986). Differentiation state-dependent surface mobilities of two forms of the neural cell adhesion molecule. *Nature*, **324** (6096), 462-5
- Pollerberg G E, et al.** (1987). The 180-kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM is involved in a cell-cell contacts and cytoskeleton-membrane interactions. *Cell Tissue Res*, **250** (1), 227-36
- Prange O, et al.** (2004). A balance between excitatory and inhibitory synapses is controlled by PSD-95 and neuroigin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101** (38), 13915-20
- Pruss T, et al.** (2004). Homophilic interactions of chick neurofascin in trans are important for neurite induction. *European Journal of Neuroscience*, **20** (11), 3184-3188
- Pruss T, et al.** (2006). A regulated switch of chick neurofascin isoforms modulates ligand recognition and neurite extension. *Molecular and Cellular Neuroscience*, **31** (2), 354-365
- Rao A, et al.** (1998). Heterogeneity in the molecular composition of excitatory postsynaptic sites during development of hippocampal neurons in culture. *Journal of Neuroscience*, **18** (4), 1217-1229

- Rao A, et al.** (2000). Mismatched appositions of presynaptic and postsynaptic components in isolated hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*, **20** (22), 8344-8353
- Rathjen F G, et al.** (1987). Neurofascin: a novel chick cell-surface glycoprotein involved in neurite-neurite interactions. *Cell*, **51** (5), 841-9
- Reid T, et al.** (1999). Identification and characterization of hPEM-2, a guanine nucleotide exchange factor specific for Cdc42. *J Biol Chem*, **274** (47), 33587-93
- Saghatelian A K, et al.** (2004). Reduced GABAergic transmission and number of hippocampal perisomatic inhibitory synapses in juvenile mice deficient in the neural cell adhesion molecule L1. *Molecular and Cellular Neuroscience*, **26** (1), 191-203
- Sanes J R; Lichtman J W** (2001). Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat Rev Neurosci*, **2** (11), 791-805
- Sara Y, et al.** (2005). Selective capability of SynCAM and neuroligin for functional synapse assembly. *Journal of Neuroscience*, **25** (1), 260-270
- Sassoe-Pognetto M, et al.** (1995). Colocalization of gephyrin and GABAA-receptor subunits in the rat retina. *J Comp Neurol*, **357** (1), 1-14
- Scheiffele P, et al.** (2000). Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell*, **101** (6), 657-69
- Scheiffele P** (2003). Cell-cell signaling during synapse formation in the CNS. *Annual Review of Neuroscience*, **26**, 485-508
- Schmid R S, et al.** (1999). NCAM stimulates the Ras-MAPK pathway and CREB phosphorylation in neuronal cells. *J Neurobiol*, **38** (4), 542-58
- Schmid R S, et al.** (2000). A MAP kinase-signaling pathway mediates neurite outgrowth on L1 and requires Src-dependent endocytosis. *J Neurosci*, **20** (11), 4177-88
- Schuster T, et al.** (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. *J Neurobiol*, **49** (2), 142-58
- Scotland P, et al.** (1998). Nervous system defects of AnkyrinB (-/-) mice suggest functional overlap between the cell adhesion molecule L1 and 440-kD AnkyrinB in premyelinated axons. *J Cell Biol*, **143** (5), 1305-15
- Serafini T** (1997). An old friend in a new home: cadherins at the synapse. *Trends Neurosci*, **20** (8), 322-3
- Shapiro L, et al.** (1995). Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature*, **374** (6520), 327-37
- Sherman D L; Brophy P J** (2005). Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat Rev Neurosci*, **6** (9), 683-90
- Sherman D L, et al.** (2005). Neurofascins are required to establish axonal domains for saltatory conduction. *Neuron*, **48** (5), 737-742

- Silletti S, et al.** (2000). Plasmin-sensitive dibasic sequences in the third fibronectin-like domain of L1-cell adhesion molecule (CAM) facilitate homomultimerization and concomitant integrin recruitment. *J Cell Biol*, **149** (7), 1485-502
- Song J Y, et al.** (1999). Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96** (3), 1100-5
- Stepanyants A, et al.** (2002). Geometry and structural plasticity of synaptic connectivity. *Neuron*, **34** (2), 275-88
- Stoyanov O, et al.** (2000). Geometric invariant core for the CL and CH1 domains of immunoglobulin molecules. *J Comput Biol*, **7** (5), 673-84
- Sugita S, et al.** (2001). A stoichiometric complex of neuexins and dystroglycan in brain. *J Cell Biol*, **154** (2), 435-45
- Sytnyk V, et al.** (2002). Neural cell adhesion molecule promotes accumulation of TGN organelles at sites of neuron-to-neuron contacts. *Journal of Cell Biology*, **159** (4), 649-661
- Sytnyk V, et al.** (2006). NCAM promotes assembly and activity-dependent remodeling of the postsynaptic signaling complex. *Journal of Cell Biology*, **174** (7), 1071-1085
- Tait S, et al.** (2000). An oligodendrocyte cell adhesion molecule at the site of assembly of the paranodal axo-glial junction. *J Cell Biol*, **150** (3), 657-66
- Tamura K, et al.** (1998). Structure-function analysis of cell adhesion by neural (N-) cadherin. *Neuron*, **20** (6), 1153-63
- Togashi H, et al.** (2002). Cadherin regulates dendritic spine morphogenesis. *Neuron*, **35** (1), 77-89
- Trachtenberg J T, et al.** (2002). Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature*, **420** (6917), 788-94
- Tuvia S, et al.** (1997). The phosphorylation state of the FIGQY tyrosine of neurofascin determines ankyrin-binding activity and patterns of cell segregation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94** (24), 12957-62
- van den Pol A N, et al.** (1998). Early synaptogenesis in vitro: role of axon target distance. *J Comp Neurol*, **399** (4), 541-60
- Varoqueaux F, et al.** (2004). Neuroligin 2 is exclusively localized to inhibitory synapses. *Eur J Cell Biol*, **83** (9), 449-56
- Varoqueaux F, et al.** (2006). Neuroligins determine synapse maturation and function. *Neuron*, **51** (6), 741-54
- Volkmer H, et al.** (1996). Neurofascin induces neurites by heterophilic interactions with axonal NrCAM while NrCAM requires F11 on the axonal surface to extend neurites. *J Cell Biol*, **135** (4), 1059-69
- Volkmer H, et al.** (1998). Dissection of complex molecular interactions of neurofascin with axonin-1, F11, and tenascin-R, which promote attachment and neurite formation of tectal cells. *J Cell Biol*, **142** (4), 1083-93

- Volkmer H** (2001). The immunoglobulin superfamily of cell adhesion molecules. In: Cell Adhesion, pp 1-29, Oxford
- Walmod P S, et al.** (2004). Zippers make signals: NCAM-mediated molecular interactions and signal transduction. *Neurochem Res*, **29** (11), 2015-35
- Washbourne P, et al.** (2004). Cell adhesion molecules in synapse formation. *Journal of Neuroscience*, **24** (42), 9244-9249
- Williams A F; Barclay A N** (1988). The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol*, **6**, 381-405
- Williams A F, et al.** (1989). Structural diversity in domains of the immunoglobulin superfamily. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **54 Pt 2**, 637-47
- Williamson R A, et al.** (1997). Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in Dag1-null mice. *Hum Mol Genet*, **6** (6), 831-41
- Wojcik S M, et al.** (2004). An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in postnatal development and control of quantal size. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101** (18), 7158-63
- Yamagata M, et al.** (2003). Synaptic adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol*, **15** (5), 621-32
- Zhang X, et al.** (1998). Structural requirements for association of neurofascin with ankyrin. *Journal of Biological Chemistry*, **273** (46), 30785-30794

LEBENS LAUF

Nadine Kerstin Burkarth
Geburtstag und –ort: 14.02.1979 in Mutlangen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Promotion

Anfertigung dieser Arbeit von Januar 2005 bis Januar 2008 am Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut an der Universität Tübingen (NMI) in Reutlingen unter Betreuung von Herrn PD Dr. Hansjürgen Volkmer.

Wissenschaftliche Tätigkeit

01/2004 - 12/2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Phytomedizin, Universität Hohenheim

Thema: „Identifizierung differenziell exprimierter Gene in *H. armigera* (Baumwollkapselwurm) nach Infektion entomopathogener Pilze“

03/2004 - 05/2004 Forschungsaufenthalt an der Andhra Universität, Andhra Pradesh und am International Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT), Hyderabad, Indien

Studium

06/2002 - 04/2003 Diplomarbeit am Institut für Pflanzenzüchtung, Populationsgenetik und Saatgutforschung, Universität Hohenheim, Stuttgart

Thema: „Isolation von SCMV-Resistenzgenkandidaten für *Scmv1* und *Scmv2* aus *Z. mays* (Mais) durch BAC-Screening“

10/1998 - 11/2003 Studium der Agrarbiologie, Fachrichtung Agrarbiotechnologie Universität Hohenheim, Stuttgart

Schulbildung

1989 - 1998 Abitur, Parler-Gymnasium, Schwäbisch Gmünd

1985 - 1989 Grundschule