

**Bedeutung des Zelladhäsionsmoleküls Neurofascin
für Prozesse der Synapsenbildung und
-Stabilisierung im *in vitro* und *in vivo* Modell**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Diplom-Biologin Sabine Trinks
aus Dresden

Tübingen
2012

Tag der mündlichen Qualifikation:

02. Oktober 2012

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Hansjürgen Volkmer

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Andreas Nieder

Erklärung

„Ich erkläre hiermit, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel: „Bedeutung des Zelladhäsionsmoleküls Neurofascin für Prozesse der Synapsenbildung und -Stabilisierung im *in vitro* und *in vivo* Modell“ selbständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen (alternativ: Zitate) als solche gekennzeichnet habe. Ich erkläre, dass die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Universität Tübingen (Beschluss des Senats vom 25.5.2000) beachtet wurden. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft wird.“

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

Tübingen, _____

(Unterschrift)

*„ES KANN SEIN, DASS NICHT ALLES WAHR IST,
WAS EIN MENSCH DAFÜR HÄLT, DENN ER KANN IRREN,
ABER IN ALLEM, WAS ER SAGT, MUSS ER WAHRHAFTIG SEIN.“*

IMMANUEL KANT

Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Prof. Dr. Hansjürgen Volkmer für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Forschungsgruppe anzufertigen, die hervorragende Betreuung und die interessante Themenbereitstellung, sowie die Chance an nationalen und internationalen Kongressen teilzunehmen.

Ferner gilt mein Dank Prof. Dr. Andreas Nieder für die Begutachtung dieser Doktorarbeit.

Weiterhin gilt mein Dank Dr. Martin Kriebel für die ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft bei fachlichen Fragen, sowie seine motivierenden Worte bei auftretenden Problemen und die ehrlich geteilte Freude bei Erfolgen.

Ein weiterer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe für die herzliche Aufnahme und ständige Unterstützung und Hilfsbereitschaft im Laboralltag. Vielen Dank an Roswitha Fischer, Ursula Härle, Sybille Glock, Jenny Klostermann, Thomas Hees und Christine Dürr für die hilfreichen methodischen Tipps.

Weiterer Dank gebührt allen Kollegen des Großraumbüros und des dritten Stocks für die fröhliche und produktive Arbeitsatmosphäre, insbesondere Dr. Jana Müller, Björn Tränkle und Simone Beuter. Ganz besonderer Dank gilt Jennifer Wuchter für die wunderbare Zusammenarbeit und die gemeinsamen Kongressbesuche, sowie die gegenseitige Unterstützung während des gesamten Doktoranden-Dasein.

Besonders herzlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die immer für mich da sind und mich in allen angegangenen Vorhaben unterstützen. Die mich vorantreiben, an mich glauben und mich auffangen, wenn ich falle. Vielen Dank dafür.

Außerdem danke ich von ganzem Herzen Marcus Fleischhauer, der mit mir durch alle Höhen und Tiefen gegangen ist und dabei niemals von meiner Seite gewichen ist. Danke für die aufbauenden Worte und die Motivation, das ständig offene Ohr und die viele Kraft, die ich dadurch erhalten habe.

.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung.....	2
2.1 Hippocampus.....	2
2.1.1 Aufbau	3
2.1.2 Funktion.....	4
2.2 Chemische Synapsen.....	5
2.2.1 Inhibitorische Synapsen	6
2.3 Zelladhäsionsmoleküle – Neurofascin	8
2.4 Affektive Störungen - Posttraumatische Belastungsstörung (PTBS).....	11
3 Zielstellung	13
4 Material und Methoden	14
4.1 Material.....	14
4.1.1 Verbrauchsmaterialien.....	14
4.1.2 Geräte	14
4.1.3 Antikörper	16
4.1.4 Chemikalien und Lösungen	17
4.1.5 Puffer und Lösungen	17
4.1.6 Kits	21
4.1.7 Medien und Antibiotika	22
4.1.8 Zelllinien	23
4.1.9 Bakterienstämme.....	24
4.1.10 Tiere	24
4.1.11 Verwendete Arzneimittel.....	24
4.1.12 Plasmidkarten.....	25
4.2 Methoden.....	26
4.2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	26
4.2.1.1 Transformation von Bakterien.....	26

4.2.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen im präparativen Maßstab.....	26
4.2.1.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkultur in analytischem Maßstab.....	27
4.2.1.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	27
4.2.1.5	Restriktionsverdau von DNA.....	28
4.2.1.6	Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	29
4.2.1.7	Gelextraktion nach Qiagen	30
4.2.1.8	Ligation.....	30
4.2.1.9	RNA-Isolierung und PCR.....	30
4.2.1.10	DNase-Verdau.....	32
4.2.1.11	Reverse-Transkriptase (RT)-PCR	33
4.2.1.12	Polymerasekettenreaktion – PCR.....	34
4.2.1.13	Klonierung von Neurofascin-166myc-tag (NF166mt):.....	36
4.2.1.14	Klonierung von Neurofascin – 5te FNIII-ähnliche Domäne	38
4.2.1.15	Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)	40
4.2.1.16	Westernblot	45
4.2.2	Allgemeine Zellkultivierung.....	48
4.2.2.1	Kultivierung der humanen HEK293FT-Zelllinie/HT1080-Zelllinie/HeLa-Zelllinie	48
4.2.2.2	Präparation hippocampaler Neurone	49
4.2.2.3	Transfektion mit Lipofectamine 2000™	50
4.2.2.4	Immunzytochemische Verfahren	52
4.2.3	Stereotaktische Verfahren/lentiviraler Gentransfer in vivo	53
4.2.3.1	Bestimmung der Injektionskoordinaten.....	53
4.2.3.2	Stereotaktische Injektion lentiviraler Partikel	54
4.2.3.3	Transkardiale Perfusion.....	55
4.2.3.4	Präparation von Hirschnitten mittels Vibratom.....	56
4.2.3.5	Immunhistochemische Verfahren	56
4.2.4	Auswertung und Statistik	57
5	Ergebnisse.....	58
5.1	Expressionsprofile neuronaler Neurofascin-Isoformen in vitro und in vivo	58
5.2	Klonierung und Charakterisierung der NF-5teFNIII-Isoform	61

5.3	Wirkung der verschiedenen Neurofascin-Isoformen auf Gephyrin-Aggregat-Formierungen am AIS in vitro	63
5.3.1	Neurofascin reduziert endogene Gephyrin-Aggregate	63
5.3.2	Neurofascin vergrößert exogene EGFP-markierte Gephyrin-Aggregate.....	64
5.4	Knockdown von Neurofascin in vivo	66
5.4.1	Infektion des Gyrus dentatus in vivo	67
5.4.2	Validierung des shRNA-vermittelten NF-Knockdowns.....	68
5.4.3	Verminderte NF-Expression verursacht Reduktion inhibitorischer Strukturen am AIS in vivo	69
5.5	Quantitative Expressionsanalyse neuronaler Neurofascin-Isoformen in gestressten Rattengehirnen.....	73
5.6	Überexpression von NF166 in vivo.....	77
5.6.1	Expression und Lokalisierung von NF166mt in vitro.....	77
5.6.2	Funktion von NF166mt in HeLa-Zellen und Neuronen	78
5.6.3	NF166-Überexpression in vivo	80
5.6.3.1	Expression von NF166mt am AIS.....	80
5.6.3.2	NF166-Überexpression verändert die Größe inhibitorischer synaptischer Strukturen.....	81
5.7	Einfluss eines Activin-Rezeptor-Inhibitors auf die NF-Expression in vitro	84
6	Diskussion	86
6.1	Modulatorischer Einfluss von Zelladhäsionsmolekülen auf die Gephyrin-Assemblierung an der postsynaptischen Membran	87
6.2	Neurofascin 180 im strukturellen und funktionellen Vergleich mit bekannten Neurofascin-Isoformen.....	91
6.3	Relevanz eines in vitro Systems im Vergleich zum in vivo System ...	92
6.4	Einfluss von Stress auf das zentrale Nervensystem.....	94
7	Literaturverzeichnis	100

Abkürzungsverzeichnis

A	adult
Abb.	Abbildung
AIS	Axoninitialesegment
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar(e)
bidest.	bidestilliert
bzw.	beziehungsweise
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DIV	days in vitro
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>Desoxyribonucleic acid</i>
dsRNA	doppelsträngige RNA
E	embryonal
EGFP	Grün fluoreszierendes Protein, <i>Enhanced green fluorescent protein</i>
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
FKS	Fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
i.p.	intraperitoneal
KG	Körpergewicht
min	Minute
mM	milli Molar
μM	mikro Molar
μm	mikro Meter
mRNA	messenger RNA
n	nano
NF	Neurofascin
nt	Nukleotid(e)

OD	Optische Dichte
P	postnatal
PBS	Phosphate Buffered Saline
PLL	Poly-L-Lysin
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure, <i>Ribonucleic acid</i>
RNAi	RNA Interferenz
rcf	relative centrifuge force
rel.	relativ
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
s.c.	subcutan
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ü.N.	über Nacht
u.a.	unter anderem
VGSC	<i>voltage gated sodium channel</i> (spannungsgesteuerter Natriumkanal)
v/v	Volumenprozent
v/w	Gewichtsprozent
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Zusammenfassung

Affektive Störungen, wie Depressionen, Angsterkrankungen oder das Posttraumatische Stresssyndrom nehmen in der heutigen Zeit einen immer höheren Stellenwert ein. Molekulare Mechanismen, die diesen Erkrankungen zugrunde liegen, sind nur unzureichend bekannt. Stress wurde bereits mehrfach als mögliche Ursache molekularer Veränderungen und Netzwerkstörungen beschrieben. Ebenso wurde Zelladhäsionsmolekülen eine große Bedeutung bei affektiven Störungen zugeschrieben. Neurofascin gehört der Ig-Superfamilie der Zelladhäsionsmoleküle an. Seine Lokalisation ist hauptsächlich auf das Axoninitialsegment (AIS) neuronaler Zellen beschränkt. In dieser Arbeit wurde die Bedeutung der neuronalen Neurofascin-Isoformen (NF166/NF180/NF186) auf inhibitorische Synapsenbildung und -stabilisierung sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* untersucht.

Dabei konnten modulatorische Effekte auf das Gerüstprotein Gephyrin in primären neuronalen Zellen am AIS beobachtet werden. Außerdem zeigte die shRNA-vermittelte Reduktion der Neurofascinexpression im *Gyrus dentatus* juveniler Ratten eine Abnahme prä- und postsynaptischer Strukturen am AIS. Des Weiteren konnte juveniler Stress im ventralen *Gyrus dentatus* von Ratten einen Anstieg der NF180-Expression bewirken, wodurch ein möglicherweise jugendlicherer Status erreicht wird. Durch Überexpression der embryonalen Isoform NF166 in den *Gyrus dentatus* sollten mögliche Effekte einer Hochregulierung eruiert werden. Tatsächlich zeigten sich prä- und postsynaptisch Volumenzunahmen der inhibitorischen Strukturen nach Überexpression. Dies zeigt, dass Neurofascin einen Einfluss auf prä- und postsynaptische Strukturen am AIS hat. Eine weitere Analyse, welchen regulatorischen Faktoren diese Neurofascinexpression unterliegt, muss durchgeführt werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine spezifische Activinrezeptor-Inhibition die Neurofascin-Expression reduziert. Welche Mechanismen dieser Regulation zugrunde liegen, muss weiter untersucht werden.

2 Einleitung

Das Gehirn ist mit seinen annähernd 10^{11} Neuronen (Nervenzellen) und einer vielfachen Anzahl an Gliazellen das komplexeste Organ des menschlichen Organismus. Jedes Neuron, bestehend aus Soma, Axon und Dendriten, bildet wiederum etwa 1000 synaptische Verbindungen aus, wodurch ein umfassendes, neuronales Netzwerk mit bis zu 10^{15} Synapsen entsteht. Die Komplexität dieses Organs wird allerdings nicht nur durch diese immensen Dimensionen begründet, sondern auch durch die Tatsache, dass eine hohe Anzahl verschiedener Neuronen-Typen existiert, welche in funktionell und strukturell unterschiedlichen Kompartimenten des Gehirns organisiert sind. Verbindungen zwischen den einzelnen Neuronen entstehen durch Aussendungen von Axonen und die Bildung von Synapsen. Je mehr Synapsen zwischen zwei Neuronen existieren, umso verlässlicher und stärker ist ihr Zell-Zellkontakt (Hyman, 2005, Kandel *et al.*, 2000). Unter normalen, wie auch pathologischen Bedingungen verändern sich diese Zell-Zellkontakte zwischen Neuronen ständig (Goda & Davis, 2003). Bis zum heutigen Tag ist sehr wenig darüber bekannt, wie Neurone ihre Kommunikationspartner finden und wieviele Synapsen zwischen diesen gebildet werden. Diese Prozesse zu verstehen, würde eine neue Möglichkeit eröffnen, in Pathologien von beispielsweise affektiven Störungen wie Posttraumatischer Belastungsstörung, Angsterkrankungen und Depression eingreifen zu können, um diese besser behandeln zu können. In diesem Hinblick soll daher die Funktion des Hippocampus, inhibitorischer chemischer Synapsen und wichtiger synaptischer Proteine dargestellt werden. Anschließend wird kurz auf den Zusammenhang zwischen affektiven Störungen und molekularen Veränderungen eingegangen.

2.1 Hippocampus

Der Hippocampus als größter Teil des Archikortex ist Bestandteil und zentrale Schaltstation des limbischen Systems, zu welchem unter anderem die Amygdala, entorhinaler-, perirhinaler- und piriformer Kortex, Gyrus cinguli und der Mamillarkörper

zählen.(Maclean, 1952). Aus dem Allokortex entstanden, gehört der Hippocampus evolutionär gesehen zu den ältesten Strukturen des Gehirns.

2.1.1 Aufbau

Die Hippocampusformation lässt sich in die Subregionen *Subiculum*, *Cornu Ammonis* (CA, Ammonshorn) und *Gyrus dentatus* unterteilen. Ferner kann das *Cornu ammonis*

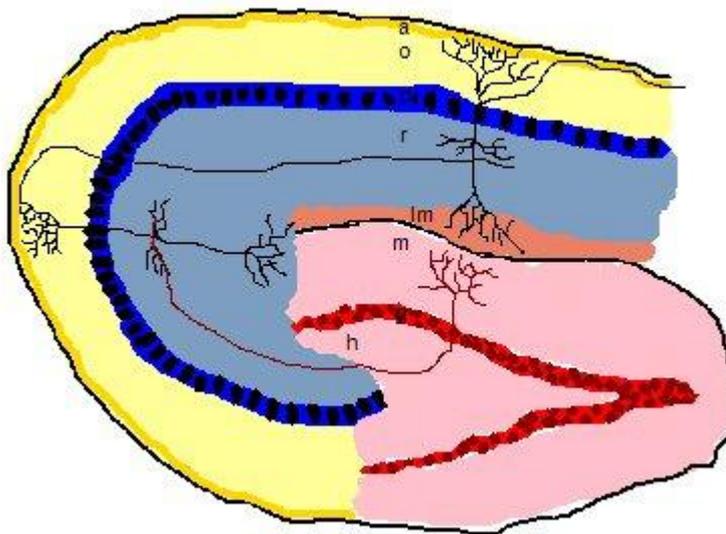


Abb. 1. Querschnitt durch den Hippocampus der Ratte. (a) *Alveus*; (o) *Stratum oriens*; (p) *Stratum pyramidale*; (r) *Stratum radiatum*; (lm) *Stratum lacunosum/moleculare*; (m) *stratum moleculare*; (g) *Stratum granulosum*; (h) *Hilus*.

in die CA1-CA4-Region untergliedert werden, beginnend mit CA1- und CA2-Region (Abb. 1): Die hier vorherrschenden Pyramidenzellen sind weniger dicht gepackt und im *Stratum pyramidale* lokalisiert (Pyramidenzellband). Ihre Dendritenbäume reichen in die beiden Schichten *Stratum oriens* (o) und *Stratum radiatum* (r). Die sich anschließende CA3-Region,

mit viel dichter gepackten Pyramidenzellen, befindet sich in der sogenannten „Kurve“ des Hippocampus. Die CA4 Region, auch Hilus (h) genannt, bildet dann den Übergang zum *Gyrus dentatus*. (Knowles, 1992) Der *Gyrus dentatus* besteht in erster Linie aus Neuronen des Körnerzellentyps, welche im Körnerzellband, dem *Stratum granulosum* (g), lokalisiert sind. Ihre Dendriten reichen in die innere und äußere Molekularschicht (*Stratum moleculare* (m)) des *Gyrus dentatus*. Dieser Bereich wird als Eingangsportal des Hippocampus bezeichnet, da hier die meist exzitatorischen Afferenzen des entorhinalen Kortex auf die Dendritenbäume der Körnerzellen treffen. Dieser Fasertrakt wird als *Tractus perforans* bezeichnet (Patton & McNaughton, 1995). Die Afferenzen innervieren neben den bereits genannten Körnerzellen auch inhibitorische Interneurone, wie Korb (Somata-Innervation) - und Kandelaber (AIS-Innervation) -Zellen und erzeugen dadurch zum einen eine

Vorwärtshemmung (*feed-forward inhibition*), aber auch eine negative Rückkopplung (*feedback inhibition*) (Freund & Buzsaki, 1996, Soriano & Frotscher, 1989). Über Moosfasern (Axone) innervieren die Körnerzellen die Pyramidenzellen des Pyramidenzellbandes der Subregion CA3. Diese wiederum stehen mit ihren apikalen Dendriten-Endigungen über sogenannte Schaffer-Kollateralen in Verbindung mit den Pyramidenzellen der CA1-Region, wo die Informationen den Hippocampus über das Subiculum wieder verlassen. Aus diesem Grund wird die Projektionsweise des Hippocampus auch als „trisynaptisch“ bezeichnet. Dennoch existieren viele weitere Projektionen sowohl innerhalb des Hippocampus, als auch zu benachbarten Hirnarealen, bis hin zum kontralateralen Hippocampus (Knowles, 1992). Entlang der longitudinalen Achse kann der Hippocampus in einen dorsalen und ventralen Teil unterschieden werden. Beide Teile sind vom generellen Aufbau sehr ähnlich. Dennoch existieren morphologische und funktionelle Unterschiede. Diskutiert wird, ob sie unterschiedlichen neuronalen Schaltkreisen angehören (Moser & Moser, 1998). Diese neuronalen Netzwerke unterscheiden sich, bezogen auf ihre Beschaffenheit, zum Beispiel in der Anzahl von Mooszellen, sowie in der Dichte noradrenerger, serotonerger und adrenerger Terminalen. Beides ist im ventralen Part des Hippocampus, relativ zum dorsalen Part gesehen, erhöht (Gage & Thompson, 1980). Dafür existieren im dorsalen Hippocampus mehr Platz-Zellen als im ventralen Part (Jung *et al.*, 1994). Dies verursacht funktionelle Unterschiede zwischen dorsalem und ventralem Hippocampus.

2.1.2 Funktion

Der gesamte Hippocampus wird mit einer Vielzahl verschiedener Funktionen in Zusammenhang gebracht. Neben kognitiven Aufgaben werden Funktionen wie Gedächtnis und Lernen (spatial, episodisch, kontextbezogen) mit dem Hippocampus assoziiert. Stress (Dedovic *et al.*, 2009, Jacobson & Sapolsky, 1991) und Emotionsabläufe spielen ebenso eine entscheidende Rolle. Aufgrund bereits erwähnter diverser anatomischer Unterschiede wird diskutiert, ob der Hippocampus in zwei funktionelle Kompartimente eingeteilt werden kann, den dorsalen (rostralen) und den ventralen (kaudalen) Hippocampus. Im Folgenden werden funktionelle Unterschiede zwischen den beiden Kompartimenten dargestellt (Fanselow & Dong, 2010).

Verschiedene Läsionsstudien weisen darauf hin, dass die zwei Drittel des dorsalen Hippocampus für räumliches Gedächtnis verantwortlich zu sein scheinen. Der ventrale Hippocampus macht ein Drittel der Hippocampus-Struktur aus und hat viele Afferenzen zur Amygdala und dem rostralen Hypothalamus (Amaral & Witter, 1989, Witter, 2007). Dies legt nahe, dass der ventrale Hippocampus mit neuroendokrinen, emotionalen und autonomen Systemen interagiert. Neurotoxische Läsionen des ventralen Subiculum, durch welche wichtige Efferenzen zum Hypothalamus beeinträchtigt sind, führen zu Hyperglukokortikoid-Sekretion und erhöhtem Stressverhalten. Daraus kann eine mögliche Involvierung in die Regulierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse vermutet werden (Herman *et al.*, 2005).

2.2 Chemische Synapsen

Synapsen werden als Kontaktstelle zwischen zwei Nervenzellen bzw. zwischen einer Nervenzelle und einer Muskelzelle definiert. Dabei kann ein Neuron eine hohe Anzahl synaptischer Verknüpfungen ausbilden. Die Erregungsübertragung durch Synapsen kann entweder durch elektrische Synapsen (*gap junctions*), bidirektional und ohne Zeitverzögerung stattfinden, oder durch eine chemische Erregungsübertragung. Diese Reizweiterleitung durch chemische Synapsen ist unidirektional und minimal zeitverzögert (1 ms). Dabei wird ein elektrisch ankommendes Aktionspotential durch Ausschüttung von Neurotransmittern in ein chemisches Signal umgewandelt (Kandel *et al.*, 2000). Die chemische Synapse ist die häufigste, im zentralen Nervensystem vorkommende, Synapsenart (Hyman, 2005). Es werden drei verschiedene chemische Synapsentypen, je nach ihrer Lokalisation (axo-somatisch, -dendritisch, -axonisch), unterschieden.

Eine chemische Synapse besteht aus drei strukturellen Elementen, einer Präsynapse, einem 20-40 nm breiten synaptischen Spalt und einer Postsynapse. Die Präsynapse ist räumlich exakt gegenüber der Postsynapse gelegen. In der Präsynapse befinden sich verschiedene Proteine, welche die Verpackung und Freisetzung von Neurotransmittern regulieren. Diese werden bei ankommendem Aktionspotential in den synaptischen Spalt entlassen. Dieser besteht maßgeblich aus stabilisierenden Komponenten der Extrazellulär-Matrix.

Die Postsynapse besteht aus der postsynaptischen Membran, die eine hohe Anzahl von Rezeptoren und Proteinen an der Membran konzentriert, der sogenannten „postsynaptischen Dichte“ (PSD) (Kneussel & Loebrich, 2007). Die postsynaptischen Rezeptoren werden durch verschiedene Struktur- und Gerüstproteine an der Membran verankert. Die Rezeptoren ragen dabei in den synaptischen Spalt hinein. Hier binden schließlich die Neurotransmitter aus der Präsynapse und lösen dadurch eine Signalkaskade aus (Scheiffele, 2003).

Es werden zwei Synapsentypen hinsichtlich ihrer Morphologie unterschieden. Zum einen die exzitatorischen (Gray Typ I) Synapsen, welche ein erregendes Signal, meist durch den Neurotransmitter Glutamat, an der Zielzelle auslösen und die inhibitorischen Gray Typ II Synapsen, welche ein hemmendes Signal an der Zielzelle, meist durch den Neurotransmitter GABA (-Aminobuttersäure), hervorrufen (Lardi-Studler & Fritschy, 2007). Im Folgenden soll der Fokus auf die inhibitorischen Synapsen gelegt werden.

2.2.1 Inhibitorische Synapsen

Die zwei häufigsten Neurotransmitter inhibitorischer Synapsen sind Glyzin und GABA (-Aminobuttersäure). Während der Neurotransmitter Glyzin vornehmlich im Hirnstamm und Rückenmark lokalisiert ist, kommt der Neurotransmitter GABA mit seinen GABAergen Synapsen im gesamten zentralen Nervensystem vor (Kneussel & Loebrich, 2007, Malosio *et al.*, 1991). Mit Hilfe der Glutamat-Decarboxylase (GAD65/67) entsteht in der inhibitorischen Präsynapse aus der Aminosäure Glutamat der Neurotransmitter GABA. Dieser wird in Vesikel verpackt, welche bei Ankunft eines Aktionspotentials an der „aktiven Zone“ der präsynaptischen Membran in den synaptischen Spalt entlassen werden. Nun kann der Neurotransmitter GABA an GABA-Rezeptoren der postsynaptischen Dichte (PSD) binden. Die inhibitorische postsynaptische Dichte unterscheidet sich von der exzitatorischen nicht nur hinsichtlich ihrer Rezeptoren. Die Proteine der inhibitorischen PSD besitzen im Gegensatz zu denen der exzitatorischen PSD keine PDZ-Domänen (*PSD-95/Discs large/Zona occludens-1*) (Lardi-Studler & Fritschy, 2007). Damit unterscheiden sich inhibitorische Synapsen prinzipiell von exzitatorischen Synapsen und können über spezielle Markerproteine voneinander unterschieden werden (Lardi-Studler & Fritschy, 2007). Auch bei den GABA-Rezeptoren kann man zwei Typen voneinander

unterscheiden. Es gibt ionotrope GABA_A-Rezeptoren und metabotrope GABA_B-Rezeptoren, wobei der Fokus hier auf GABA_A-Rezeptoren liegt, da deren Anordnung und Funktion mit affektiven Störungen in Verbindung gebracht wird (Jacobson-Pick *et al.*, 2008, Zheng *et al.*, 2009). GABA_A-Rezeptoren sind ionotrope Pentamere, bestehend aus einer sehr heterogenen Zusammensetzung der verschiedenen GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten (α_1-6 , α_1-4 , α_1-4 , α_2 , α_1-3 , α_5). Die Zusammensetzung des Rezeptors wird mit dessen spezifischer Funktion assoziiert (Fritschy & Brunig, 2003). Die am häufigsten vorkommende Komposition der Untereinheiten eines GABA_A-Rezeptors im ZNS ist 2 α_1 , 2 α_2 und 1 α_5 (Baumann *et al.*, 2001). Durch die Bindung des Neurotransmitters an den Rezeptor kommt es zu einer Konformationsänderung der GABA_A-Rezeptoren und damit zum Öffnen des Ionenkanals. Die GABA_A-Rezeptoren sind Transmembranproteine, welche unter anderem durch Gephyrin an der Membran verankert werden. Gephyrin ist ein Tubulin-bindendes Gerüstprotein, welches durch Oligomerisierung eine hexagonale Gerüststruktur an der postsynaptischen Membran ausbildet. Immunhistologische Analysen zeigen eine Kolo-kalisation von GABA_A-Rezeptoren und Gephyrin. Eine direkte Interaktion zwischen den beiden postsynaptischen Komponenten konnte mit der α_2 - und α_3 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors nachgewiesen werden (Lardi-Studler & Fritschy, 2007, Tretter *et al.*, 2011). Eine Besonderheit stellt das Axoninitialsegment (AIS) mit der exklusiven Innervation durch die sogenannten Kandelaberzellen (Chandelier-Neurone) dar. Diese GABAergen Neurone sind für den inhibitorischen Input am AIS verantwortlich und regulieren somit die Feuerraten der jeweiligen Zellen (Howard *et al.*, 2005, Somogyi *et al.*, 1983).

Axoninitialsegment

Das Axoninitialsegment (AIS) ist ein hochspezialisiertes Kompartiment des Axons, welches sich an den Axonhügel anschließt und zwischen 11 μm und 40 μm lang ist. Die hohe Spezialisierung in Struktur und Funktion ist durch die Assemblierung spezifischer Proteine, an diesem Teil des Axons, charakterisiert. Beispielsweise wird eine hohe Natriumkanal-Dichte beschrieben (Carras *et al.*, 1992), welche für das Absinken des Schwellenpotentials der Membran verantwortlich ist und zur Generierung der Aktionspotentiale an dieser Stelle beiträgt.

Neben einer Anreicherung von Natriumkanälen werden auch Kaliumkanäle, Ankyrin G (AnkG), IV-Spektrin und die Zelladhäsionsmoleküle NrCAM und Neurofascin am AIS assembliert. Hedstrom et al. zeigten, dass durch den *Knockdown* von AnkG die Lokalisation aller anderen Proteine des AIS gestört ist (Hedstrom et al., 2007). Nach *Knockdown* von NrCAM, Neurofascin und IV-Spektrin wird die Zusammensetzung der AIS-Komponenten allerdings nicht gestört.

Des Weiteren konnte Ango et al. zeigen, dass in zerebellären Purkinjezellen ein Neurofascin-Gradient vom Soma hin zum AIS besteht. Dieser korreliert mit der Ausdehnung der Korbzell-Terminalen, den sogenannten „Pinceau-Synapsen“. AnkG stabilisiert diesen Gradienten, denn nach *Knockout* von AnkG konnte keine gradientenabhängige Pinceau-Synapsenverteilung am AIS mehr beobachtet werden (Ango et al., 2004).

2.3 Zelladhäsionsmoleküle – Neurofascin

Als Zelladhäsionsmoleküle (**C**ell **A**dhesion **M**olecules – CAMs) werden Proteine bezeichnet, welche Kontakte zwischen Zellen bzw. zwischen Zellen und Extrazellulär-Matrix (Integrine) vermitteln (Dalva et al., 2007). Dadurch wird ein Zusammenhalt des Gewebes erzeugt und eine interzelluläre Kommunikation ermöglicht. Die Interaktion der Zelladhäsionsmoleküle kann homophilen oder heterophilen Charakters sein und *in cis* oder *in trans* stattfinden (Alberts, 1995).

Des Weiteren sind CAMs an zahlreichen Prozessen bei der Synapsenbildung und – Stabilisierung beteiligt. Bei diesen Prozessen sind verschiedene Klassen von Zelladhäsionsmolekülen involviert.

Bei der Klasse der Cadherine handelt es sich um kalziumabhängige Transmembranproteine, welche hauptsächlich über homophile Interaktionen Zell-Zell-Kontakte vermitteln. Sie sind über -Catenine am Aktinzytoskelett verankert und spielen eine wichtige Rolle bei frühen Prozessen der Synaptogenese, sowie der Kontaktstabilisierung. Des Weiteren werden sie mit der Bildung exzitatorischer Synapsen in Verbindung gebracht (Dalva et al., 2007).

Eine weitere Klasse von CAMs ist die Immunglobulinsuperfamilie (IgSF). Es handelt sich um Transmembranproteine, welche sich durch eine variable Anzahl extrazellulärer Ig-ähnlicher Domänen (stabilisiert über Disulfidbrücken zweier

Cysteine) und einer unterschiedlichen Anzahl an Fibronectin-Wiederholungseinheiten des Typs III (FNIII-ähnliche Domäne) auszeichnen. Neben SynCAM, welches sowohl prä- als auch postsynaptisch auftreten kann, muss auch das neuronale Zelladhäsionsmolekül (*neuronal cell adhesion molecule*) NCAM genannt werden. NCAM wird eine Rolle beim Neuritenauswachsen, sowie bei Prozessen von exzitatorischer Synapsenbildung und -stabilisierung zugeschrieben. Es existieren drei Hauptisoformen (NCAM120, NCAM140, NCAM180), welche sich nur in ihrer zytoplasmatischen Domäne unterscheiden (Dalva *et al.*, 2007, Washbourne *et al.*, 2004).

Weitere Mitglieder der IgSF sind die CAMs der L1-Untergruppe. Dieser Untergruppe wiederum gehören neben L1 auch Neurofascin, NrCAM und CHL1 an. Sie sind vermutlich an der inhibitorischen Synaptogenese beteiligt (Saghatelian *et al.*, 2004).

Neurofascin

Neurofascin wurde erstmalig im Huhn entdeckt (Rathjen *et al.*, 1987). Dabei konnte ein Neurofascin-Gen identifiziert werden, dass aus 33 Exons besteht und dessen

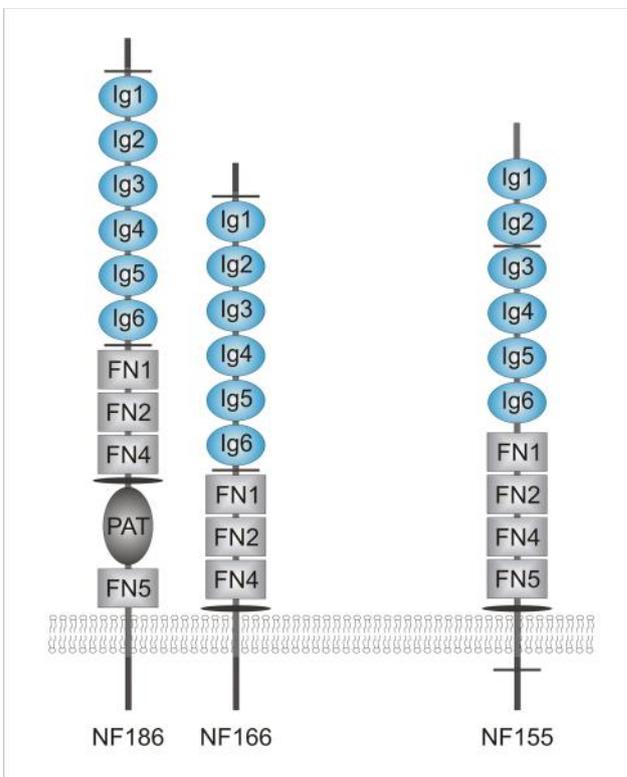


Abb. 2. Häufigste Neurofascin-Isoformen.

Neuronal: NF186 und NF166

Glia: NF155

mRNA 8,5 kb groß ist. Strukturell ist Neurofascin, wie auch die anderen Mitglieder der L1-IgSF, durch sechs Immunglobulin-ähnliche Domänen, bis zu fünf FNIII-ähnliche Domänen, einer Transmembrandomäne und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne gekennzeichnet. Aufgrund diverser potentieller Sequenzen für alternatives Spleißen entsteht eine Vielfalt von Neurofascin-Isoformen. Mögliche Spleißstellen befinden sich an der PAT-Domäne (Prolin, Alanin, Threoninreiche Domäne), der dritten und fünften FNIII-ähnliche Domäne, zwischen zweiter und dritter Ig-ähnlicher Domäne und am NH₂-Terminus. Die durch

alternatives Spleißen entstehenden drei Haupt-Isoformen des Neurofascins sind in Abb. 2 dargestellt (Hassel et al., 1997, Rathjen et al., 1987). NF166 und NF186 sind neuronale Isoformen, wohingegen die NF155-Isoform von Gliazellen wie Schwannzellen und Oligodendrozyten exprimiert wird. NF155 besitzt vier FNIII-ähnliche Domänen (1-4), interagiert mit Contactin und Paranodin und ist an der Bildung der Paranodien beteiligt (Schafer et al., 2004, Sherman et al., 2005).

Neuronales Neurofascin ist auf auswachsenden Neuriten (Rathjen et al., 1987), sowie in reiferen Neuronen am Axoninitialsegment und an den Ranvier'schen Schnürringen zu finden (Kriebel et al., 2011, Zonta et al., 2011). Die zwei neuronalen NF-Isoformen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Komposition der FNIII-ähnlichen Domänen und dem Vorhandensein der PAT-Domäne. NF166 wurde im Huhn entdeckt, besitzt keine PAT-Domäne und besteht aus den FNIII-ähnlichen Domänen 1, 2 und 4. NF186 unterscheidet sich von NF166 durch die zusätzliche fünfte FNIII-ähnliche Domäne und das Vorhandensein der PAT-Domäne. Dadurch kann es, aufgrund von sterischen Veränderungen, zu unterschiedlichen Affinitäten diverser Interaktionspartner kommen (Koticha et al., 2005, Pruss et al., 2006). Neben der Assoziation von NrCAM am AIS von Purkinjezellen (Davis et al., 1996) interagiert Neurofascin 166 *in cis* mit dem FGFR1, und verbindet somit extrazelluläre Signale mit der intrazellulären Signaltransduktion (Kirschbaum et al., 2009). Weitere direkte Interaktionen finden zwischen Ankyrin G und Neurofascin, durch Phosphorylierung des FIGQY-Motivs des Neurofascins, statt (Jenkins et al., 2001). Dadurch könnte die Lokalisation von Neurofascin am AIS bestimmt werden. Durch Interaktionen mit Proteinen der extrazellulären Matrix (EZM), wie beispielsweise mit Brevican, wird eine AIS-spezifische EZM assembliert (Hedstrom et al., 2007). Weiterhin weisen die Isoformen des Neurofascinproteins unterschiedliche zeitliche Expressionsmuster auf, wodurch ihnen unterschiedliche physiologische Bedeutungen zugeschrieben werden können. NF166 ist in für die Entwicklung relevanten Stadien exprimiert und wird eine Funktion beim Auswachsen von Neuriten und der Entstehung von Gephyrin-Aggregaten am Axonhügel beigemessen. Währenddessen wird NF186 erst zu späteren Zeitpunkten exprimiert und zeigt eine hemmende Wirkung auf das Neuritenwachstum und die *de novo* Gephyrin-Bildung am Axonhügel (Burkhardt et al., 2007, Pruss et al., 2006, Volkmer et al., 1998).

Am AIS von Neuronen des *Gyrus dentatus in vivo* wird nach *Knockdown* von NF186 in adulten Ratten eine Reduktion synaptischer Spots beobachtet. Dies deutet auf eine wichtige Rolle von NF186 in der Stabilisierung inhibitorischer Synapsen hin (Burkhardt *et al.*, 2007, Kriebel *et al.*, 2011).

2.4 Affektive Störungen - Posttraumatische Belastungsstörung (PTBS)

Eine Posttraumatische Belastungsstörung entsteht laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) als nachträgliche Antwort auf ein traumatisches Erlebnis (tieftrender negativer Stress-Disstress). Betroffene erleben das traumatische Geschehen immer wieder in Form von sogenannten „*flashbacks*“. Sie isolieren sich von ihrer Umwelt, stumpfen emotional ab, weisen eine erhöhte Reizbarkeit und Schreckhaftigkeit auf und leiden unter Schlaflosigkeit und Anhedonie. Die Symptomatik der Angsterkrankung und Depression geht mit der PTBS einher und kann bis zur Persönlichkeitsveränderung und zu Suizidgedanken führen. Die Wahrscheinlichkeit in der allgemeinen Bevölkerung eine Posttraumatische Belastungsstörung zu entwickeln beträgt zwischen 8-10%. Stress mit seinen Auswirkungen auf verschiedene molekulare und funktionale Systeme im Gehirn, als Ursache affektiver Störungen wie beispielsweise PTBS, gilt es zu untersuchen.

Charakteristisch für PTBS und Depression sind reduzierte Hippocampus-Volumina im Vergleich zum gesunden Probanden (Vaiva *et al.*, 2004, Villarreal *et al.*, 2002), begründet auf molekularen Veränderungen im zentralen Nervensystem. Solche molekularen Veränderungen konnten unter anderem im inhibitorischen System und insbesondere mit GABA_A-Rezeptoren im ZNS in Verbindung gebracht werden.

Mit GABA_A-Rezeptoren und affektiven Störungen wird auch Activin assoziiert. Activin ist ein Mitglied der TGF -Superfamilie (transforming growth factor). Es bindet an einen Activin-Rezeptor Typ II (ACVR2A, ACVR2B), welcher einen Activinrezeptor Typ I (ALK4/5/7) rekrutiert und diesen an der intrazellulären GS-(Glyzin/Serin) Domäne phosphoryliert. Die Phosphorylierung bewirkt eine Konformationsänderung, welche wiederum eine Phosphorylierung von an der Membran lokalisierten SMAD-Proteinen auslöst. Diese Smad-Proteine (Smad2/3) oligomerisieren im Zytoplasma mit einem Co-Smad (Smad4). Der entstandene Smad-Komplex gelangt in den

Nukleus, wo er an die DNA des Zielgens bindet und Transkription auslösen kann (Heldin *et al.*, 1997, Massague *et al.*, 1994). Activin ist ein multifunktionelles Protein, welches sowohl die Proliferation, als auch hormonelle Prozesse reguliert. Jüngst konnte von Werner *et al.* gezeigt werden, dass Activin bei der Geweberegenerierung, Fibrose und inflammatorischen Erkrankungen eine große Bedeutung zu haben scheint (Werner & Alzheimer, 2006). Auch im zentralen Nervensystem wird Activin eine wichtige Rolle zugesprochen. Neben einer antidepressiven Wirkung von Activin im Hippocampus von Ratten (Dow *et al.*, 2005) konnte in transgenen Mäusen durch Activin-Inhibierung ein ängstlicher Phänotyp hervorgerufen werden (Ageta *et al.*, 2008). Zengh *et al.* brachten Activin wiederum mit GABA_A-Rezeptoren in Verbindung. Außerdem konnten unter anderem Veränderungen in der GABA-Neurotransmitterfreisetzung detektiert werden. Somit bestehen starke Hinweise darauf, dass Activin prä- und postsynaptische Komponenten GABAerger Synapsen beeinflusst (Zheng *et al.*, 2009).

Um den Zusammenhang zwischen Pathologien des ZNS und molekularen Veränderungen, die mit diesen Pathologien einhergehen, zu verstehen, bedarf es noch zahlreicher Ideen und weitreichender Forschung.

3 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit ist die weiterführende funktionelle Analyse und Charakterisierung der Neurofascin-Isoformen in dissoziierten hippocampalen Neuronen. Außerdem soll die Funktion von Neurofascin in juvenilen Ratten *in vivo*, sowie der Einfluss von Stress auf neuronale Neurofascin-Isoformen, eruiert werden.

Zur Realisierung dieses Projektes sollten diverse neuronale Neurofascin-Isoformen in primäre hippocampale Neurone eingebracht werden, um den Einfluss der jeweiligen Isoform auf die inhibitorische Struktur Gephyrins, hinsichtlich seiner Aggregat-Größe und –Anzahl, zu analysieren.

In wieweit ein Effekt auf inhibitorische Strukturen nach shRNA-vermittelter Neurofascin-Reduktion im komplexen System, *in vivo*, bestätigt werden kann, sollte im Anschluss geklärt werden.

In einer Kooperation mit der Universität Haifa, Israel, sollten weiterhin mögliche Effekte von Stress auf die neuronalen Isoformen eruiert werden. Unterschiede im Neurofascin-Expressionsmuster sollten durch eine quantitative RT-PCR von verschieden gestressten Ratten analysiert werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Validierung möglicher Effekte der embryonal-prominenten Neurofascin-Isoform nach Überexpression im Hippocampus *in vivo*.

Schließlich sollten mögliche Gründe für Veränderungen im Expressionsmuster von Neurofascin eruiert werden. Dafür sollte ein Zusammenhang mit Activin, einem Mitglied der TGF- β -Familie, untersucht werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Verbrauchsmaterialien

Die Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen CARL ROTH GmbH & Co. KG (Karlsruhe), ROCHE (Mannheim), MERCK (Darmstadt), SIGMA-ALDRICH (Taufkirchen), GREINER BIO-ONE, (Frickenhausen), EPPENDORF (Hamburg), PEQLAB (Erlangen), CORNING (New York, USA), SARSTEDT (Nürnbrech), INNOVATIVE LABOR SYSTEME (Stützerbach), BD BIOSCIENCE (Bedford USA) und BIOCHROME (Cambridge, GB) bezogen.

4.1.2 Geräte

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Geräte und Materialien verwendet:

Agarose-Gel

Dokumentations-System

INTASCIENCE IMAGING INSTRUMENTS
GMBH, Göttingen

Autoklav

H+P LABORTECHNIK, Oberschleißheim

Biophotometer

EPPENDORF, Hamburg

Binokular Stemi V6

CARL ZEISS MICROIMAGING GmbH, Göttingen

Brutschrank

WTB BINDER, Tuttlingen

CLSM 510 Meta

CARL ZEISS MICROIMAGING GmbH, Göttingen

Elektrophoresekammer

FISHER SCIENTIFIC GmbH, Schwerte

7500 Fast Real-Time PCR-System

APPLIED BIOSYSTEMS Inc., USA

GFL Wasserbad

GFL, Burgwedel

Incubator shaker C25

NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, Nürtingen

Kanülen, Sterican 0,8 X40 mm

B. BRAUN MELSUNGEN AG, Melsungen

Magnetrührer Ikamag®

IKA-WERKE GmbH & CO. KG, Staufen

Megafuge 1.0R

HERAEUS INSTRUMENTS, Osterode

Mikroskop Axiovert 200M

ZEISS, Oberkochen

Mikroskop Nikon Eclipse TE300

NIKON, Japan

Multiplate-Reader, PHERAstar

BMG LABTECH, Offenburg

Nahtmaterial, Prolene-Faden	ETHICON; JOHNSON&JOHNSON MEDICAL GMBH, Norderstedt
Neubauer Zählkammer	BRAND, Wertheim
PCR-Gerät Primus 96 plus MWG	BIOTECH AG, Ebersberg
Platform-Schwenker DuoMax 2030	HEIDOLPH, Schwabach
Präparations-/OP-Besteck	FINE SCIENCE TOOLS GMBH, Heidelberg AESCLAP AG, Tuttlingen
Rasierklingen	WILKINSON SWORD GmbH, Solingen
SDS-PAGE-Kammer	BIORAD, München
Sekundenkleber	UHU GMBH & Co KG, Bühl / Baden
Skalpellklingen	SCHREIBER GmbH, Fridingen
Spritzen, Omnican-F	B. BRAUN MELSUNGEN AG, Melsungen
Sterilbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
ThermocyclerT3000	BIOMETRA GmbH, Göttingen
Thermomixer compact	EPPENDORF, Hamburg
Vortex Heidolph REAX 2000	HEIDOLPH, Schwabach
Waage BP 3100S	SARTORIUS, Göttingen
Waage AE160	METTLER, Giessen
Zentrifuge Universal 2S	HETTICH, Schweiz
Zentrifuge Mikro 20	HETTICH, Schweiz
Zentrifuge 5415C	EPPENDORF, Hamburg
Zentrifuge 5810R	EPPENDORF, Hamburg

4.1.3 Antikörper

In der vorliegenden Arbeit kamen folgende Antikörper zur Anwendung.

Primärantikörper:

Bezeichnung	Wirtsspezies	Arbeitskonzentration	Hersteller
anti-c-myc (9E10)	Maus	1:50	Abcam plc, Cambridge, UK
Anti-GABAA Rezeptor, β -UE	Maus	1:200	Chemicon, Temecula, CA. USA
Anti-GABAA Rezeptor, 2-UE	Kaninchen	1:200	Synaptic Systems GmbH, Göttingen
anti-GAD65, Glutamatdecarboxylase	Kaninchen	1:1000	Chemicon, Hampshire, UK
Anti-Gephyrin	Maus	1:100	Synaptic Systems GmbH, Göttingen
Anti-Gephyrin	Kaninchen	1:100	Synaptic Systems GmbH, Göttingen
anti MAP2, Microtubuli assoziiertes Protein-2	Maus	1:1000	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
anti MAP2, Microtubuli assoziiertes Protein-2	Kaninchen	1:1000	Millipore GmbH, Eschborn
anti-NF, Neurofascin, cytoplasmatische Domäne, R. norvegicus	Kaninchen	1:1000	laboreigen
anti-PSD-95, Postsynaptische Dichte-95	Kaninchen	1:100	Cell signaling, NEB, Frankfurt am Main
anti-VGSC, <i>voltage gated sodium channel</i> , Natriumkanal	Maus	1:100	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
anti-VGSC, <i>voltage gated sodium channel</i> , Natriumkanal	Kaninchen	1:100	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

Tab. 1: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper

Sekundärantikörper:

Bezeichnung	Wirtsspezies	Arbeitskonzentration	Hersteller
Cy3-anti- <i>mouse</i>	Ziege	1:500	Dianova GmbH, Hamburg
Cy3-anti- <i>rabbit</i>	Ziege	1:500	Dianova GmbH, Hamburg
Cy5-anti- <i>mouse</i>	Ziege	1:500	Dianova GmbH, Hamburg
Cy5-anti- <i>rabbit</i>	Ziege	1:500	Dianova GmbH, Hamburg

Tab. 2: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Sekundärantikörper

4.1.4 Chemikalien und Lösungen

Die Chemikalien wurden, soweit nicht anderweitig beschrieben, von den Firmen CARL ROTH GmbH & Co. KG, SIGMA-ALDRICH CHEMIEGMBH (Taufkirchen) oder PAA-LABORATORIESGMBH (Pasching) bezogen.

4.1.5 Puffer und Lösungen

Folgende Puffer und Lösungen wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

TAE-Puffer (50x) (DNA-Gelpuffer)

2 M Tris

250 mM Natriumacetat

50 mM EDTA

pH 7,8 mit 96% (v/v) Essigsäure

DNA-Auftragspuffer (5x)

8,7% (v/v) Glycerol

50 mM Na₂ - EDTA

0,25% (w/v) Bromphenolblau

in TAE Puffer (10x)

Ethidiumbromid-Lösung

10 mg/ml Ethidiumbromid

in ddH₂O

TRIS (1 M)

121,14 g in 1 l ddH₂O

pH 7,5

TBE-Puffer (10x)

1 M TRIS

0,9 M Borsäure

0,01 M EDTA

TE-Puffer

10 mM Tris

1 mM EDTA

pH 8,0

4% PFA/PBS

40 g PFA

in 1 l PBS, pH 7,4

20% (v/v) Triton X-100

20 ml Triton X-100

ad 1 l bidest. Wasser

0,2% (v/v) TritonX-100/1xBMB/1xPBS

100 µl 20% Triton X-100

ad 10 ml 1 x BMB/1 x PBS

0,6% (v/v) TritonX-100/1xBMB/1xPBS

300 µl 20% Triton X-100

ad 10 ml 1 x BMB/1 x PBS

20% Glukose

20 g D(+)-Glukose

ad 100 ml bidest. Wasser; sterilfiltriert

HBSS-HEPES-Puffer

1000 ml HBSS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} , ohne Phenolrot

7 ml 1 M HEPES

10 ml Penicillin/ Streptomycin (100x)

1 M HEPES

23,83 g HEPES

ad 100 ml ddH₂O; pH 7,3

sterilfiltriert

5,5% NaHCO₃

5,5 g NaHCO₃

ad 100 ml ddH₂O; sterilfiltriert

5% PEI

Polyethylenimine 50% (w/v)

1:10 mit H₂O verdünnen

3% (v/v) BM/H₂O

3 ml BM flüssig

ad 100 ml H₂O

Blockierungsreagenz (10x) (BMB)

100 g Blocking Reagent for ELISA (ROCHE HOLDING GMBH, Mannheim)

in 100 ml H₂O

70% Ethanol

700 ml Ethanol (99,9% unvergällt; 96% vergällt)

in 300 ml ddH₂O

Trypsin-EDTA-Hepes-Puffer

100 ml Trypsin- EDTA

1 ml 1 M HEPES, pH 7,3

1 ml Penicillin-Streptomycin (100x)

10x SDS-Laufpuffer

250 mM Tris

192 M Glycin

1x SDS-Laufpuffer

25 mM Tris

192 mM Glycin

0,1% (w/v) SDS

4x SDS-Probenladepuffer

1 ml LDS-Sample Buffer (Invitrogen Karlsruhe)

32 µl Mercaptoethanol

Lysepuffer

10 mM Tris-HCl pH7,5

100 mM EDTA

10 mM NaCl

0,5% (v/v) Triton-X-100

0,5% (w/v) Natriumdesoxycholat

Blotting-Puffer

25 mM Tris

192 M Glycin

20% (v/v) Methanol (pH 8,5)

10x TBS (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)

24,2 g Tris

80 g NaCl

ad 1 lddH₂O; mit HCL pH 7,6 einstellen

TBST (TBS -Tween 20)

0,1% (v/v) Tween 20 in 1 x TBS

Entwicklerlösung (Westernblot)

100 ml Feinstkornentwickler (Ultrafin Plus, TETENAL AG & CO. KG, Norderstedt)
ad 500 ml H₂O

Fixiererlösung (Westernblot)

62,5 ml Express Fixierbad (Superfix Plus, TETENAL AG & CO. KG, Norderstedt)
ad 500 ml H₂O

10% Ammoniumpersulfat (APS) - Lösung

1 g APS in 10 ml H₂O lösen
aliquotiert einfrieren

5% Milchpulverlösung

5 g Milchpulver in 100 ml TBST lösen

4.1.6 Kits

HiSpeed® Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAfilter Plasmid Midi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
RNAqueous®-4PCR Kit	APPLIED BIOSYSTEMS, Darmstadt
RNA-STAT 60™ Reagent	AMS BIOTECHNOLOGY, Bioggio-Lugano, Schweiz
RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix	APPLIED BIOSYSTEMS, Darmstadt
Amersham™ ECL™ Prime-Kits	GE HEALTHCARE LIFE SCIENCE, München

4.1.7 Medien und AntibiotikaLB-Medium

10 g Difco™Bacto-Tryton (BECTON-DICKINSON GmbH, Heidelberg)

5 g Difco™Bacto-Hefeextrakt (BECTON-DICKINSON GmbH, Heidelberg)

8 g NaCl

auf 1 l H₂O auffüllen, autoklavieren

Selektions-Agarplatten

15 g Difco™Bacto-Tryton (BECTON-DICKINSON GmbH, Heidelberg)

in 1 l LB-Medium, autoklavieren

auf 55°C abkühlen lassen, 1/1000 Volumen Ampicillin zugeben und gießen

Ampicilinsulfat (1000x)

25 mg/ml Ampicilinsulfat in bidest. H₂O

sterilfiltrieren

Kanamycinsulfat (1000x)

25 mg/ml Kanamycinsulfat in ddH₂O

Sterilfiltrieren

293FT-Medium

500 ml DMEM

5 ml L-Glutamin

5 ml NEAA

50 ml FKS

5 ml G 418 Sulfat (50mg/ml)

293FT-Medium (vor der Virusproduktion) / HT1080-Medium

500 ml DMEM

5 ml L-Glutamin

5 ml NEAA

50 ml FKS

NMEM-B27-Medium (Neuronen-Medium)

50 ml 10 x MEM Earles ohne Glutamin und NaHCO₃(INVITROGEN, Karlsruhe)

5 ml Pyruvat-Lösung (100 x)

5 ml Glutamin (200 mM)

20 ml NaHCO₃ (5,5%)

15 ml Glukose (20%)

10 ml B27 Supplement (INVITROGEN, Karlsruhe)

ad 500 ml ddH₂O; sterilfiltrieren

HeLa-Medium

500 ml EMEM

5 ml L-Glutamin

5 ml NEAA

50 ml FKS

4.1.8 Zelllinien293 FT-Zellen (INVITROGEN, Karlsruhe)

293FT-Zellen werden zur Produktion lentiviraler Partikel eingesetzt und sind humanen Ursprungs. Mutterzelllinie ist die 293F Zelllinie aus der embryonalen Niere (Human Embryonic Kidney-HEK). 293FT-Zellen exprimieren stabil das SV40 large T Antigen, welches hohe virale Titer im Zuge der Virusproduktion ermöglicht.

HT1080-Zellen

Die ursprüngliche Zelllinie wurde aus einem Fibrosarkom isoliert und als epithelial-ähnliche Zelllinie etabliert.

HeLa-Zellen

HeLa-Zellen stammen aus einem Zervix-Karzinom und sind humanen Ursprungs. Sie wurden der Patientin **Henrietta Lacks** entfernt und als erste permanente Zelllinie etabliert.

4.1.9 Bakterienstämme

DB3.1™	INVITROGEN, Karlsruhe
One Shot® Stbl3™ E. coli	INVITROGEN, Karlsruhe

4.1.10 Tiere

Für die Präparation primärer hippocampaler und kortikaler Neurone wurden Embryonen (E17/18) aus trächtigen weiblichen Sprague Dawley Ratten entnommen. Die stereotaktischen Operationen wurden an 27 bis 29 Tage alten weiblichen Sprague Dawley Ratten durchgeführt.

Für Organentnahmen zum Zweck der Präparation primärer Neurone, sowie stereotaktische Injektionen lentiviraler Partikel in das Nagergehirn lagen Genehmigungen durch das Regierungspräsidium Tübingen vor, Versuchs-Nr. NMI 2/08.

Die Haltung der Tiere erfolgte unter Standardbedingungen, zwölf Stunden Tag/Nacht-Zyklus und Wasser und Nahrung *ad libitum*.

4.1.11 Verwendete Arzneimittel

Ketaminhydrochlorid, 10%	WDT EG, Garbsen
Lidocainhydrochlorid, 2%	BELA-PHARM GMBH&CO. KG, Vechta
Rimadyl® (Carprofen)	PFIZER GMBH, Karlsruhe
Vet-Sept®-Lösung, 10%	ALBRECHT GMBH, Aulendorf
Xylazinhydrochloridlösung, 2%	ALVETRA GMBH, Neumünster

4.2 Methoden

4.2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

4.2.1.1 Transformation von Bakterien

Um fremde DNA in kompetente Bakterien einzuschleusen, kam die Hitzeschockmethode zur Anwendung. Hierbei wurden je nach Plasmid-Eigenschaften verschiedene chemisch kompetente Bakterien transformiert (Stbl3; DB3.1; INVITROGEN, Karlsruhe). Die bei -80°C gelagerten Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut, inkubierten kurz mit der zu transformierenden DNA und wurden anschließend für 45 Sekunden bei 42°C dem sogenannten Hitzeschock unterzogen. Dabei destabilisiert sich die Bakterienmembran und die DNA gelangt in die Zelle. Direkt im Anschluss kühlten die transformierten Bakterien zwei Minuten auf Eis. Nach Zugabe von 200 μl S.O.C.-Medium (INVITROGEN, Karlsruhe) inkubierten die Bakterien eine Stunde bei 37°C und wurden anschließend auf Agarplatten selektioniert.

4.2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen im präparativen Maßstab

Zur Plasmidpräparation wurde das QIAfilter Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Hilden) verwendet. Die Plasmidpräparation von 50 ml einer Übernacht-Bakterienkultur erfolgte nach den Herstellerangaben. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei $6000 \times g$ und 4°C wurde das Bakterienpellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Anschließend wurden 10 ml des Lysepuffers P2 zugegeben, die Mischung kurz invertiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Folgenden wurden 10 ml des eiskalten Neutralisationspuffers P3 zugegeben und kräftig geschüttelt. Die entstandene Lösung wurde in den QIAfilter Einsatz überführt. Nach zehnmütiger Inkubation entstanden zwei Phasen. Die obere trübe Phase enthielt unter anderem Zelldebris, genomische DNA und Proteine, die untere klare Phase die gewünschte Plasmid-DNA. Zur Vorbereitung der Filtration der klaren unteren Phase wurde die QIAGEN tip Säule mit 10 ml QBT Puffer äquilibriert. Nach zwei Waschschrinen mit je 10 ml QC-Puffer erfolgte die Eluierung der Plasmid-DNA von der Säule mit 5 ml QF-Puffer. Durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol, kräftiges Schütteln und 20 minütiger

Zentrifugation bei 4°C wurde die DNA gefällt. Das entstandene Pellet wurde durch Zugabe von 2 ml 70% Ethanol und Zentrifugation für 10 min bei 4°C gewaschen. Nach 10 minütigem Trocknen an der Luft wurde das gereinigte Plasmid-DNA-Pellet in 50 µl ddH₂O aufgenommen und gelöst. Im Anschluss an die photometrische Konzentrationsbestimmung und einem Kontroll-Restriktionsverdau wurde die Plasmid-DNA bei -20°C gelagert.

4.2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkultur in analytischem Maßstab

Die Plasmidpräparation im analytischen Maßstab ist eine gute Möglichkeit, schnell und effizient kleine Mengen Plasmid-DNA zu isolieren, um durch einen Restriktionsverdau korrekte Plasmid-Klone identifizieren zu können. Die Plasmidisolierung erfolgte aus einer 6-stündig inkubierten 4 ml Bakterienkultur (Selektions-LB-Medium, angeimpft mit einem Bakterienklon). 1 ml dieser Bakterienkultur wurde aufbewahrt, um später eine 50 ml Flüssigkultur anzupfen.

Die verbliebenen 3 ml wurden bei 5000 rpm pelletiert. Anschließend wurde das Plasmid-DNA-Pellet in 200 µl Puffer 1 (QIAGEN, Hilden), einem Resuspensions-Puffer, gelöst. Durch Zugabe von Puffer 2 (QIAGEN, Hilden), einem Lyse-Puffer, wurden die Zellen bei wiederholtem Invertieren lysiert. Durch Zugabe von Puffer 3 (QIAGEN, Hilden), einem Neutralisations-Puffer, wurde das basische Gemisch neutralisiert und die Lyse-Reaktion gestoppt. Nach 10 Minuten maximaler Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Standard-Reaktionsgefäß überführt und mit 600 µl Isopropanol versetzt und gut geschüttelt. Nach 10 – 20 Minuten maximaler Zentrifugation kam es zur Ausfällung der Plasmid-DNA. Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Pellet in 500 µl 70% Ethanol aufgenommen und erneut für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals verworfen und das Plasmid-Pellet in 30 µl dd H₂O resuspendiert. 1 µl der Suspension wurde einem Restriktionsverdau entnommen.

4.2.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260 \text{ nm}$ und 280 nm . Eine Konzentration von 50 µg/ml dsDNA entspricht einer $OD_{260 \text{ nm}}$ von 1,0. Ein Wert zwischen 0,1 und 1,0 wird als eine

zuverlässige Bestimmung angesehen. Aus dem Quotienten von der $OD_{260\text{ nm}}$ und der $OD_{280\text{ nm}}$ kann bedingt eine Aussage über die Reinheit, nicht aber über die Qualität, der DNA und RNA getroffen werden. Die Nucleinsäuren werden demnach als „rein“ angesehen, wenn der Quotient einen Wert zwischen 1,8 und 2,0 annimmt.

4.2.1.5 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, welche DNA an einer spezifischen Stelle schneiden. Sie besitzen jeweils eine spezifische Erkennungssequenz. So werden definierte Spaltfragmente diskreter Länge gewonnen. Restriktionsverdau sind erforderlich um durch Restriktionsanalyse Plasmid-Vektoren auf korrekte Sequenzstruktur hin zu überprüfen oder um Vektoren im Rahmen einer Klonierung zu öffnen bzw. DNA-Fragmente herauszuschneiden.

Für den Restriktionsverdau wurden folgende Komponenten in einem 1,5 ml Standard Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) angesetzt:

0,4 - 3,0 µg Plasmid-DNA

1 µl Restriktionspuffer

1 µl Restriktionsenzym

ad 10 µl ddH₂O

Für einen präparativen Ansatz wurde jeweils die dreifache Menge der Komponenten in einem Gesamtvolumen von 30 µl eingesetzt.

Die angesetzten Restriktionsverdau inkubierten eine Stunde bei 37°C. Die DNA-Menge variierte hierbei zwischen 400 ng und 3 µg pro Verdau.

In Tab. 3 sind alle durchgeführten Restriktionsverdau mit jeweiliger Erkennungssequenz und dazugehörigem optimalen Puffersystem aufgeführt.

Enzym	Puffer	Erkennungssequenz
Bpu1102I XbaI	Puffer Tango	5'...GC TNAGC...3' 5'...T CTAGA...3'
ClaiI NdeI	Puffer 4, BSA	5'...AT CGAT...3' 5'...CA TATG...3'
EcoRI	EcoRI Puffer	5'...G AATTC...3'
AgeI NotI	EcoRI-Puffer, BSA	5'...A CCGGT...3' 5'...GC GGCCGC...3'
BamHI ClaiI	Puffer 4, BSA	5'...G GATCC...3' 5'...AT CGAT...3'
XbaI XhoI	Puffer 4, BSA	5'...T CTAGA...3' 5'...C TCGAG...3'

Tab. 3: Übersicht über die durchgeführten Restriktionsverdau. Die verwendeten Reaktions-Puffer und -Enzyme wurden von NEB, Schwalbach bzw. Fermentas, St. Leon-Rot bezogen.

4.2.1.6 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die negative Ladung von Nukleinsäuren ermöglicht eine Auftrennung der DNA-Moleküle im Agarosegel im elektrischen Feld. Verschieden große DNA-Moleküle weisen eine unterschiedliche Beweglichkeit auf. Größere Moleküle bewegen sich langsamer als kleinere Moleküle innerhalb der Agarose-Matrix. Dadurch kann mit Hilfe eines DNA-Längenstandards die Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente bestimmt werden. Kleinere Fragmente wurden in einem 1,5-2% (v/w) Agarosegel aufgetrennt. Für größere Fragmente wurden 1% (v/w) Agarosegele verwendet. Das Agarosegel wurde vor dem Polymerisieren mit 0,0075% (w/v) Ethidiumbromid versetzt und anschließend in die entsprechende Gelkammer (LKB GNA100, Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden / Fisherbrand®HK13, Fisher Scientific GmbH, Schwerte) gegossen. Ein 1 × TAE-Puffer kam als Lauf- und Gelpuffer zum Einsatz. Vor dem Auftragen der DNA-Probe wurde diese mit 2 µl (5 ×) DNA-Ladepuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Feldstärke von 5 - 10 V/cm. Als DNA-Längenstandard wurden die 1 kb DNA-Leiter und der *low molecular weight* Marker (Roth, Karlsruhe) verwendet.

4.2.1.7 Gelextraktion nach Qiagen

Die Extraktion von DNA aus einem Agarosegel erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden) nach Herstellerangaben.

Die Agarosegelbande mit der enthaltenen DNA wurde mit einer sauberen Skalpellklinge aus dem Agarosegel geschnitten und gewogen. Das 5-fache Volumen QG-Puffer wurde anschließend zur Probe dazugegeben (100 mg ~ 100 µl). Nach zehnminütiger Inkubation bei 50°C erfolgte die Zugabe und Vermischung von einem Volumen Isopropanol. Um die DNA zu binden wurde das Gemisch auf eine QIAquick-Säule gegeben und eine Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Erneut wurden 500 µl QG-Puffer auf die Säule gegeben und zentrifugiert. Anschließend wurde zweimal mit 750 µl PE-Puffer gewaschen und der jeweilige Überstand verworfen. Nach nochmaliger Zentrifugation wurde die gebundene DNA mit 30 - 50 µl ddH₂O eluiert. Anschließend erfolgte eine photospektrometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.

4.2.1.8 Ligation

Um aus PCR und Gelextraktion resultierende DNA-Fragmente in geöffnete Vektoren zu ligieren, wurden die jeweiligen Fragmente in dreifach molarem Überschuss zum Vektor gegeben. Die Berechnung der Mengen für dieses Verhältnis zeigt nachstehende Formel:

$$3 \times \text{ng PCR Produkt} = \frac{(\text{y bp PCR Produkt}) (\text{z ng Zielvektor})}{(\text{bp Zielvektor})}$$

Die Ligation wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl angesetzt. Dabei wurden der 10 x T4 DNA Ligase Puffer einfach und 1 µl T4 DNA Ligase (NEW ENGLAND BIOLABS, Ipswich, MA, GB) verwendet. Die Inkubationszeit des Ansatzes bei Raumtemperatur variierte zwischen zehn Minuten und einer Stunde.

4.2.1.9 RNA-Isolierung und PCR

Isolierung von RNA aus primären Neuronenkulturen

Für die RNA-Isolierung aus primären Neuronen der Ratte wurde das RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden) verwendet.

Zellen bis zu einer Dichte von 1×10^6 wurden mit 350 μ l RLT-Puffer vom Zellkulturboden abgeschabt und lysiert. Anschließend wurden 350 μ l 70% Ethanol dazugegeben und gemischt. Dieses Gemisch wurde auf eine RNeasy Mini-Säule mit einem 2 ml-Sammelröhrchen gegeben und für 15 s bei 8000 x g zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden 700 μ l RW1-Puffer auf die Säule gegeben und erneut 15 s bei 8000 x g zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit je 500 μ l RPE-Puffer, wobei beim ersten Waschschriff 15 s und beim zweiten Waschschriff zwei Minuten bei 8000 x g zentrifugiert wurde. Das Sammelröhrchen wurde anschließend auf ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß gesetzt um die RNA in 50 μ l RNase-freiem Wasser zu eluieren. Nach einer Zentrifugation von einer Minute und 8000 x g wurde das Eluat entweder bei -20°C eingefroren oder es folgte ein DNase-Verdau von PROMEGA, Mannheim.

Isolierung von RNA aus Gehirn-Gewebe

Um Kontamination durch RNasen zu vermeiden, musste RNase-frei gearbeitet werden. Dafür wurden Einmalhandschuhe getragen. Des Weiteren wurden alle verwendeten Glas-Materialien autoklaviert und über Nacht auf 220°C erhitzt. Plastikwaren wurden über Nacht in 1 x DEPC-Wasser (1:1000 in ddH₂O) inkubiert und anschließend autoklaviert und getrocknet.

Die RNA-Isolierung mit dem RNA STAT 60™ Reagenz (AMS BIOTECHNOLOGY, Bioggio-Lugano, Schweiz) beruht auf der Phenol-Chloroform-Extraktion. Bei dieser Methode wurden 1 ml RNA STAT 60™ zu je 100 mg Gewebe gegeben.

Gewebe	Gewicht
adultes Gehirn	ca. 1700 mg
juveniles Gehirn (postnatal Tag 28)	ca. 1400 mg
embryonales Gehirn Tag 17 (E17)	ca. 100 mg
Gehirnareal (OC/ Hippocampus/ BLA)	ca. 10 mg

Tab. 4: Übersicht über die geschätzten Gewichte verschiedener Gehirngewebe

Die Probe wurde mit einem Glas-Homogenisator bzw. Plastikpistill (ROTH, Karlsruhe) homogenisiert. Das Homogenisat wurde aus dem Glas-Homogenisator in ein 15 ml

Falcon-Röhrchen überführt und kurz inkubiert bzw. verblieb nach dem Homogenisieren noch kurz in dem jeweiligen 1,5 ml Eppendorfgefäß. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,2 ml Chloroform / 1 ml RNA STAT 60™. Nach kräftigem Schütteln und erneuter kurzer Inkubation wurde das Gemisch 15 min bei 1200 x g und 4°C zentrifugiert. Es entstand eine untere organische Phase mit Proteinen und eine wässrige RNA-enhaltende obere Phase, welche in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt wurde. Nach der Zugabe von 0,5 ml Isopropanol / 1 ml RNA STAT 60™ und 5 min Inkubation wurde die Probe leicht geschüttelt und anschließend 10 min bei 1200 x g und 4°C zentrifugiert. Das entstandene weiße Pellet wurde mit 1 ml 75%igem Ethanol / 1 ml RNA STAT 60™ gewaschen und erneut 5 min bei 7500 x g und 4°C zentrifugiert. Nach kurzem Trocknen an der Luft wurde die RNA in 50 - 500 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert. Es folgte der DNase-Verdau nach Herstellerangaben (PROMEGA, Mannheim).

4.2.1.10 DNase-Verdau

Folgende Komponenten wurden für den DNase-Verdau mit RQ1 RNase-freier DNase (PROMEGA, Mannheim) zusammengegeben.

RNA-Probe in Wasser	8 µl
RQ1 RNase-Freie DNase 10x Reaktionspuffer	1 µl
RQ1 RNase-Freie DNase	1 µl
RNase-Freies Wasser	ad 10 µl

Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 1 µl RQ1 DNase Stop-Lösung zum Ansatz gegeben um die DNase bei 65°C und 10 min zu inaktivieren.

4.2.1.11 Reverse-Transkriptase (RT)-PCR

RNAqueous®-4PCR Kit (APPLIED BIOSYSTEMS, Darmstadt)

Der gesamte Reaktionsansatz wurde auf Eis pipettiert. In einem Ansatz von 20 µl wurden bis zu 2 µg RNA eingesetzt. Für die RT-Reaktion wurden folgende Komponenten zusammengegeben.

Komponente	Menge
2 x RT-Puffer	10 µl
20 x RT-Enzymmix	1 µl
RNA-Probe	9 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Tab. 5: Pipettierschema für RT-PCR

Die Reverse Transkription fand in folgenden drei Schritten statt:

	1. Schritt	2. Schritt	3. Schritt
Temperatur	37°C	95°C	4°C
Zeit	60 min	5 min	unendlich

Tab. 6: Programm für RT-PCR

Die entstandenen cDNA Proben wurden entweder bei -20°C aufbewahrt, oder direkt in einer PCR-Reaktion eingesetzt.

M-MuLV-Transkriptase (NEW ENGLAND BIOLABS, Ipswich, MA, GB)

Zu jeweils 10 µl RNA-Lösung wurden 0,3 µl dN6-Primer (randomisierte Hexanukleotide, 150 µg/ml; ROCHE, Mannheim), sowie 0,5 µl dNTPs (25 mM) und 2,2 µl ddH₂O dazugegeben, zehn Minuten bei 70°C inkubiert und fünf Minuten auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 1,5 µl 10 x RT-Puffer und 1 µl M-MuLV Reverse Transkriptase (200 u/µl) hinzugefügt. Es folgten Inkubationen von 10 min bei 25°C, 50 Minuten bei 42°C und 15 Minuten bei 70°C. Anschließend wurde die gewonnene cDNA in PCR-Reaktionen eingesetzt oder bei -20°C aufbewahrt.

4.2.1.12 Polymerasekettenreaktion – PCR

Bei einer PCR werden Nukleinsäuren exponentiell amplifiziert. Im Folgenden aufgeführte Komponenten wurden bei dieser Methode, abhängig von der Verwendung der jeweiligen Polymerase, in einem Mikrozentrifugen-Röhrchen eingesetzt: Danach wurde der PCR-Ansatz im Thermocycler prozessiert.

REDTaq® DNA Polymerase (Sigma, Schnelldorf)

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklus-Anzahl
Initiale Denaturierung	94°C	5 Minuten	1
Denaturierung	94°C	45 Sekunden	25-30
Annealing	72°C	1 Minuten	
Extension	60°C	45 Sekunden	
Finale Extension	60°C	7 Minuten	1
Pause	4°C	unendlich	1

Tab. 7: PCR Programm unter Verwendung der REDTaq® DNA Polymerase

Komponente	Menge
10x REDTaq PCR Puffer	5 µl
dNTPs, 10 mM	1 µl
MgSO ₄ , 10 mM	2 µl
Forward Primer	1 µl
Reverse Primer	1 µl
DNA-Template	50-100 ng
REDTaq DNA Polymerase	2,5 µl
Nuclease-freies Wasser	ad 50 µl

Tab. 8: PCR Pipettierschema unter Verwendung der REDTaq® DNA Polymerase

Pfu DNA Polymerase (PROMEGA, Mannheim)

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklus-Anzahl
Initiale Denaturierung	95°C	1-2 Minuten	1
Denaturierung	95°C	30-60 Sekunden	25-35
Annealing	42-65°C	30 Sekunden	
Extension	72-74°C	2-4 Minuten	
Finale Extension	72-74°C	5 Minuten	1
Pause	4°C	unendlich	1

Tab. 9: PCR Programm unter Verwendung der Pfu DNA Polymerase

Komponente	Menge
<i>Pfu</i> DNA Polymerase 10x Puffer	5 µl
dNTPs, 10 mM	1 µl
Forward Primer	1 µl
Reverse Primer	1 µl
DNA-Template	50-100 ng
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	0,5 µl
Nuclease-freies Wasser	ad 50 µl

Tab. 10: PCR Pipettierschema unter Verwendung der Pfu DNA Polymerase

Platinum® Taq High Fidelity DNA Polymerase (INVITROGEN, Mannheim)

Komponente	Menge
10x High Fidelity PCR Puffer	5 µl
dNTPs, 10 mM	1 µl
MgSO ₄ , 10 mM	2 µl
Forward Primer	1 µl
Reverse Primer	1 µl
DNA-Template	50-100 ng
Platinum® Taq High Fidelity	0,2 µl
Nuclease-freies Wasser	ad 50 µl

Tab. 11: PCR Programm unter Verwendung der Platinum® Taq High Fidelity DNA Polymerase

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklus-Anzahl
Initiale Denaturierung	94°C	30 Sekunden - 2 Minuten	1
Denaturierung	94°C	15-30 Sekunden	25-35
Annealing	55°C	15-30 Sekunden	
Extension	68°C	1 Minute/kb PCR-Produkt	
Pause	4°C	unendlich	1

Tab. 12: PCR Pipettierschema unter Verwendung der Platinum® Taq High Fidelity DNA Polymerase

Folgende genspezifische Primer wurden für die jeweiligen PCR-Produkte verwendet. Für das Gateway®-System (INVITROGEN, Mannheim) spezifische Adaptersequenzen sind fett markiert.

4.2.1.13 Klonierung von Neurofascin-166myc-tag (NF166mt):

Für die Klonierung des NF166mt wurde folgende Klonierungsstrategie durchgeführt. Aus dem Plasmid pRev_CMV_NF166 wurde mittels spezifischer Primer das Signalpeptid (Sig-Peptid) von Neurofascin amplifiziert und mit Restriktionsschnittstellen für die Enzyme BamHI und ClaI versehen. Parallel dazu wurde der pCS2+mt-Vektor mit BamHI und ClaI im präparativen Ansatz verdaut und auf ein Agarosegel aufgetragen. Anschließend wurde die Bande des linearisierten pCS2+mt-Vektors mit einer Skalpellklinge ausgeschnitten und die DNA aus dem

Agarosegel extrahiert. Vor der Ligation wurde das amplifizierte Signalpeptid einem Restriktionsverdau mit BamHI und ClaI unterzogen, um überhängende 5' und 3'-Enden zu erhalten. Anschließend wurde die Ligrationsreaktion unter Verwendung der linearen DNA-Fragmente angesetzt. Das Ligrationsprodukt wurde danach mittels Hitzeschock in chemisch-kompetente Stbl3-Zellen (INVITROGEN, Karlsruhe) transformiert und mit Ampicillin versetzten Agarplatten ausplattiert. Nach der Inkubation im 37°C Inkubator über Nacht konnte ein Klon von der Agarplatte gepickt und nach Anzucht in LB-Flüssigmedium über Nacht wurde am Folgetag eine Plasmidpräparation in großem Maßstab angeschlossen.

Das entstandene Plasmid „pCS2+mt_Sig-Peptid“ wurde erneut im präparativen Ansatz mit den Restriktionsenzymen XbaI und XhoI geschnitten. Nach erneuter Gelelektrophorese wurde der offene pCS2+mt_Sig-Peptid-Vektor wiederum aus dem Gel herausgeschnitten und die DNA isoliert. Parallel dazu wurde aus dem pRev_CMV_NF166-Vektor Neurofascin 166 ohne die Signalpeptidsequenz mittels PCR amplifiziert und die Restriktionsschnittstellen der Enzyme XbaI und XhoI am 5'- bzw. 3'-Ende angefügt. Das amplifizierte NF166-Fragment wurde wiederum mit den Restriktionsenzymen XbaI und XhoI verdaut, um überhängende Enden zu erhalten. Anschließend wurden die linearen DNA-Fragmente ligiert und transformiert. Das entstandene Plasmid pCS2+mt_NF166 konnte aus der Bakterienkultur isoliert werden, um in der darauffolgenden PCR-Reaktion Einsatz zu finden.

Für die folgende PCR-Reaktion wurden Primer kreiert, welche sogenannte „*attachment sites*“ an das zu amplifizierende Fragment anhängen. Die hier verwendeten Anhänge werden als attB1 und attB2 bezeichnet und werden in der BP/LR-Reaktion (INVITROGEN, Karlsruhe) benötigt. Das amplifizierte attB1/attB2-NF166mt Fragment wurde mittels einer BP-Rekombination in den pDONR™221 (INVITROGEN, Karlsruhe) hinein rekombiniert. Danach wurde die LR-Rekombination nach Invitrogen Angaben durchgeführt. Dabei rekombinieren die beiden Vektoren (pDONR™221 und pLentiC04_Linkер_ccdB) miteinander, wodurch das attB1/attB2-NF166mt Fragment schließlich in dem Lentivektor pLentiC04_Linkер_NF166mt vorlag, welcher für die Produktion lentiviraler Partikel verwendet werden konnte.

NF166-Signalpeptid:

forward Primer (BamHI): 5'-TAGGAT CCA TGG TCC TGC ACA GCC ACC AG-3'

reverse Primer (ClaI): 5'-GTATCG ATC ATC CAG GGA CTT CAA TGG C-3'

NF166 ohne Signalpeptid:

forward Primer (XhoI): 5'-ATC TCG AGT CAA ATA TTC AGA GTG AAT TGC
C-3'

reverse Primer (XbaI): 5'-GAT CTA GAC TAC GCT AAT GAG TAG ATA GCA
TTG-3'

NF166mt mit attachment sites:

forward Primer (attB1): 5'-GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC
TTC GAA GGA GAT AGA ACC ATG GTC CTG CAC
AGC CAC CAG C-3'

reverse Primer (attB2): 5'-GGG GACCAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC
CTA CGC TAA TGA GTA GAT AGC ATT G-3'

Linker für pLenti-Konstrukt:

forward Primer (XhoI): 5'-TACTCGAGGCTAGCACAATTCGAG-3'

reverse Primer (Bpu1102I): 5'-ATGCTTAGCGCTAGCAGTGGCTAA-3'

Primer für CaMKII04-Promotor:

forward Primer (ClaI): 5'-GCATCGATTCTTGTGGACTAAGTTTGTTC-3'

reverse Primer (SpeI): 5'-ATACTA GTG CTG CCC CCA GAA CTA GG-3'

4.2.1.14 Klonierung von Neurofascin – 5^{te} FNIII-ähnliche Domäne

Zur Klonierung der NF-5^{te} FNIII-Isoform wurden die zwei Plasmide „pRev_CMV_NF22“ und „pRev_CMV_NF166“ verwendet. NF166 enthält das Miniexon 17, aber keine PAT-Domäne. Die Isoform NF22 ist strukturell ähnlich der Isoform NF166 enthält jedoch die PAT-Domäne aber kein Miniexon 17. Die potentiell frühe Neurofascinform der Ratte (NF-5^{te} FNIII) ist ebenfalls analog zu NF166 aufgebaut und besitzt zusätzlich die PAT-Domäne. Mithilfe der beiden Restriktionsenzyme BamHI und HindIII wurde der Part aus „pRev_CMV_NF166“ herausgeschnitten, in dem das Miniexon 17 enthalten ist. Dieses fehlt der Isoform NF22, um aus ihr eine NF-5^{te} FNIII-Isoform zu erzeugen. Im Folgenden wurde der Vektor „pRev_CMV_NF22“ mit den gleichen beiden Restriktionsenzymen BamHI und HindIII geöffnet, um den Part aus dem „pRev_CMV_NF166“ mit Miniexon in den Vektor hinein zu ligieren. Das resultierende Plasmid „pRev_CMV_NF180“ wurde

dann mittels des Restriktionsenzym NheI kontrollverdaut, um die Ligationsreaktion zu verifizieren. Das Restriktionsenzym NheI schneidet im Bereich des Miniexons 17. Schneidet das Enzym dreimal statt zweimal im neu entstandenen Vektor, dann hat eine korrekte Ligation stattgefunden, welches sich auch bestätigte.

Bestimmung der Molekularen Masse von NF-5^{te} FNIII mittels Western Blot

Zur detaillierten Bestimmung des Molekulargewichts der neuen Isoform wurde eine relative Bestimmung des Molekulargewichtes, basierend auf den aus der Literatur bekannten Werten für die Isoformen NF166 und NF186, vorgenommen. Somit kann ein Vergleich zu den bereits bekannten Molekulargewichten gezogen werden.

Bestimmt wurden die Abstände (in cm) der Neurofascin-Banden zum Trenngelrand der SDS PAGE. Diese Werte werden auf der x-Achse aufgetragen. Auf der zugehörigen y-Achse wird der Logarithmus des jeweils bekannten Molekulargewichts abgebildet. Es ergeben sich zwei Datenpunkte, für NF186 (2,05; 2,27) und für NF166 (3,1; 2,22). Daraus ergibt sich eine Geradengleichung von $y = -0,047x + 2,366$ (siehe Abb. 3). Setzt man nun in diese Gleichung den Bandenabstand x der neuen Isoform ein, erhält man den Logarithmus des Molekulargewichtes dieser Größe (2,26). Daraus ergibt sich ein Molekulargewicht von 181 kDa, woraus sich der neue Name Neurofascin 180, statt Neurofascin -5. FNIII-ähnliche Domäne (Burkhardt *et al.*, 2007) ergibt.

Proteinname	Bandenabstand x vom oberen Trenngelrand [cm]	$y = -0,0471x + 2,366$	Molekulargewicht [kDa] = 10^y
186	2,05	2,27	186,0
NF166+PAT (NF180)	2,3	2,26	181,0
166	3,1	2,22	166,0

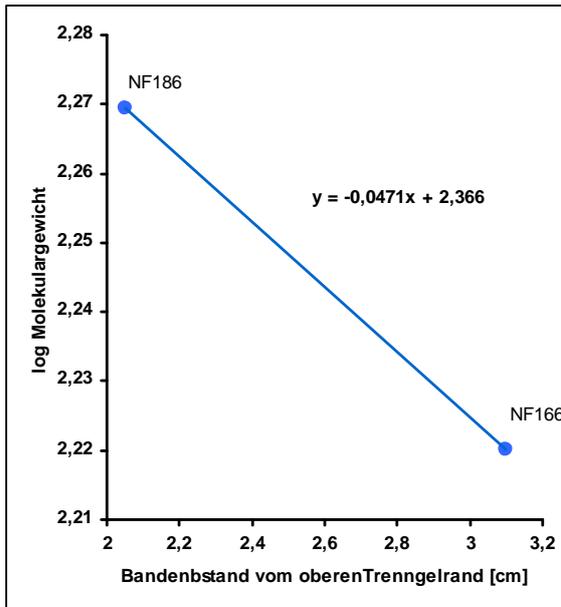


Abb. 3. Berechnung der relativen Molekularen Masse. Dargestellt ist die logarithmische Gerade zur Bestimmung der Molekularen Masse der klonierten Neurofascin Isoform. Durch Einsetzen des Bandenabstandes x aus der obigen Tabelle, resultierend aus dem Western Blot, wird erst die logarithmische Molekulare Masse bestimmt (2,26) und daraus die tatsächliche Molekulare Masse in Kilo Dalton (181 kDa).

4.2.1.15 Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

Die quantitative RT-PCR bietet im Gegensatz zu den Standard-PCR-Verfahren den Vorzug einer direkten Quantifizierung eines amplifizierten PCR-Produktes bereits während der PCR. Die Quantifizierung basiert auf Fluoreszenzmessungen. Proportional zur PCR-Produkt-Menge nimmt das Fluoreszenzsignal zu. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene qRT-PCR-Verfahren angewandt, die im Folgenden näher beschrieben sind.

Die relative Quantifizierung wurde mithilfe der „ C_T Methode“ durchgeführt. Dabei wurden die den Zyklus bestimmenden C_T Werte, bei denen die gemessene Fluoreszenz erstmals den Wert der Hintergrundfluoreszenz übersteigt, verwendet. Zur Normalisierung der C_T Werte wurde der C_T Wert aus der Differenz zwischen C_T Werten vom Gen von Interesse und dem Referenzgen GAPDH gebildet. Anschließend erfolgte eine zweite Normalisierung zwischen einer definierten Kontrolle und der jeweiligen Behandlung. Dafür wurde die Differenz aus den beiden

C_T Werten, der sogenannte C_T Wert, bestimmt. Die n -fache Expression (x) errechnet sich aus dem Einsetzen des C_T Wertes in die Gleichung:

$$x = 2^{-C_T}$$

TaqMan[®] – quantitative Real-Time (qRT)-PCR

Das Prinzip der TaqMan[®]-*Real Time* PCR basiert auf dem gleichen Prinzip wie das einer Standard-PCR. Allerdings macht die TaqMan[®]-*Real Time* PCR eine Quantifizierung der amplifizierten DNA-Mengen durch den sogenannten FRET (Förster-Resonanzenergietransfer) möglich. Wird ein Donor-Fluorochrom (Reporter) angeregt, transferiert dieses einen Teil seiner Energie an ein in der Nähe befindliches Akzeptor-Fluorochrom (Quencher). Wenn der Abstand zwischen Reporter und Quencher größer wird, nehmen zeitgleich der FRET und das Fluoreszenzsignal des Quenchers ab. Das Fluoreszenzsignal des Reporters steigt daraufhin.

Bei der TaqMan[®]-*Real Time* PCR wurden TaqMan[®]-Sonden verwendet, die am 3'-Ende einen Quencher und am 5'-Ende einen Fluoreszenzfarbstoff als Reporter (FAM / VIC) tragen. Die Taq-Polymerase mit einer 5'-Exonukleaseaktivität polymerisiert nun die zum Primer-Paar komplementäre Sequenz. Dabei wird die TaqMan[®]-Sonde abgebaut. Der Reporter wird abgespalten und entfernt sich vom Quencher. Dadurch steigt das Fluoreszenzsignal der Reporterfluoreszenz, welche detektiert und gemessen werden kann. Zur relativen Mengenbestimmung wird die Menge des Referenzgens GAPDH mitbestimmt. Dieses Haushaltsgen ist in seiner Expression konstant und stellt somit eine Referenz dar. Sowohl die Sonden für das zu amplifizierende DNA-Fragment, als auch die Sonden für GAPDH wurden aufgrund verschiedener Fluoreszenzen in derselben Kavität prozessiert (multiplexer Ansatz). Hierdurch wird eine genaue Angabe der Quantität möglich.

Folgendes Pipettierschema und PCR-Programm wurden verwendet:

Komponente	Menge	Temperatur	Zeit	Zyklus-Anzahl
GAPDH-Sonde	1 µl	95°C	20 Sekunden	1
NF-/NCAM-Sonde	1 µl	95°C	3 Sekunden	40
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix	10 µl	60°C	30 Sekunden	
cDNA	1,5 µl			
nuklease-freies Wasser	6,5 µl			
Gesamtvolumen	20 µl			

Tab. 13: Pipettierschema der TaqMan® PCR

Folgende Sonden (*TaqMan® Gene Expression Assay*, Applied Biosystems) wurden für jeweilige PCR-Produkte verwendet:

Neurofascin (FAM / MGB): Rn00588180_m1

NCAM (FAM / MGB): Rn 01418537_m1

GAPDH-Ratte (VIC® / MGB)

SYBR® Green qRT-PCR

SYBR Green I ist ein Cyanin-Fluoreszenz-Farbstoff, welcher mit doppelsträngiger DNA interkaliert. In der exponentiellen Verdopplungsphase der DNA während einer PCR steigt parallel zum doppelsträngigen PCR-Produkt auch die Fluoreszenz des SYBR-Green-Farbstoffes an, welcher sofort unspezifisch alle doppelsträngigen DNA-Sequenzen bindet. Ein Referenzgen (GAPDH) wird zur Normalisierung der Ausgangsmenge mitgeführt. Dieses sogenannte Haushaltsgen wird, wie auch beim *TaqMan®* Ansatz in den Proben nicht reguliert. Dies lässt die Bestimmung der relativen Quantität zwischen behandelten und unbehandelten Proben zu. Allerdings ist es bei der SYBR Green qRT-PCR nicht möglich das Referenz- und Zielgen innerhalb derselben Probe zu quantifizieren.

Folgendes Pipettierschema und PCR-Programm wurden verwendet:

Komponente	Menge	Temperatur	Zeit	Zyklus-Anzahl
Forward Primer (1,5µM) Endkonzentration 300nM	5 µl	95°C	10 Minuten	1
Reverse Primer (1,5µM) Endkonzentration 300nM	5 µl	95°C	15 Sekunden	40
SYBR® Green PCR Mastermix	12,5 µl	60°C	30 Sekunden	
nuklease-freies Wasser	1 µl	72°C	30 Sekunden	
cDNA	1,5 µl	95°C	15 Sekunden	1
Gesamtvolumen	25 µl	60°C	1 Minute	
		95°C	15 Sekunden	
		60°C	15 Sekunden	

Tab. 14: Pipettierschema der SYBR® Green qRT-PCR

Folgende Primer wurden für jeweilige PCR-Produkte verwendet:

NF-5^{te}FNIII (NF180)

forward Primer: 5'-GTA CCT ACC ACC GTC GCC A-3'

reverse Primer: 5'-TGG TGT AAG CGG TTT CGT GA-3'

NF186

forward Primer: 5'-TGG AAG CAC AAT TTC AGG CC-3'

reverse Primer: 5'-CTG ATG CCC TCG TTG TCC CG-3'

NF155

forward Primer: 5'-GCC TGT TCC CCT ACA GTA ACT-3'

reverse Primer: 5'-TGT CGG ACT CTG AAA CGC C-3'

GAPDH

forward Primer: 5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-3'

reverse Primer: 5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG -3'

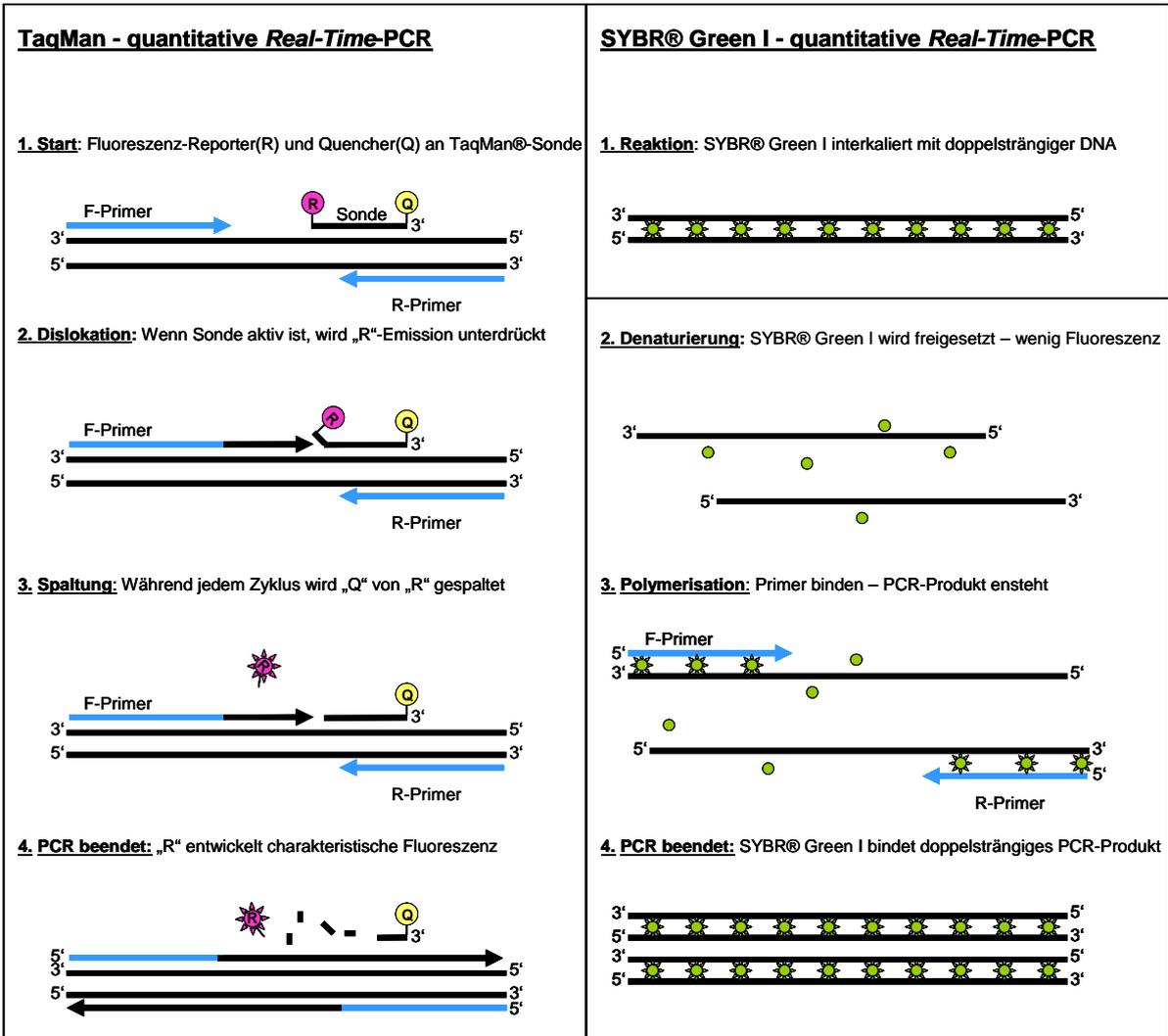


Abb. 4. Gegenüberstellung der Funktionsweise von den beiden qRT-PCR-Varianten TaqMan® und SYBR®Green.

4.2.1.16 Westernblot

Lyse von Neuronen im 12-Well-Format

Die komplette Zellyse erfolgte auf Eis. Vorsichtig wurde das Medium von den Neuronen abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und mit eiskaltem Lysepuffer 10 Minuten auf Eis inkubiert. Dabei wurden je 150 µl Lysepuffer (versetzt mit Protease-Inhibitor 1:25) auf 3 Kavitäten mit gleicher Behandlung verteilt. Danach wurden die Zellen durch triturieren mit einer Eppendorfpipette (1000 µl) lysiert. Die Zelldebris wurde durch einen Zentrifugationsschritt bei 16000 g für 10 Minuten bei 4°C pelletiert. Der Protein enthaltende Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und für die Proteinbestimmung (BCA-Assay) weiterverwendet.

Bestimmung der Proteinkonzentration – BCA-Assay

Mit dem Ziel gleiche Mengen Protein im Westernblot einzusetzen, wurde die Proteinkonzentration des jeweiligen Zellysats bestimmt. Dafür wurde der BCA-Protein-Assay (THERMO SCIENTIFIC, Schwerte) angewendet. Jeweils 25 µl der Albuminstandardreihe wurden in Duplikaten in einer 96-Well Platte vorgelegt. Dann wurden jeweils Duplikate der Lysat-Proben aufgetragen. Als Referenz kam eine Verdünnungsreihe des Proteins Rinderserumalbumin (BSA) zur Anwendung. Anschließend wurden die jeweils vorgelegten 25 µl Protein mit 200 µl Reagent aufgefüllt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Dabei reagierten die Proteine mit zweiwertigen Kupferionen. Es entstanden einwertige Kupferionen, welche zusammen mit BCA (Bicinchoninsäure) eine Reaktion eingingen. Der entstandene violette Farbstoff wurde photometrisch über die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm mit einem Spektrometer (PERKINELMER, Rodgau) gemessen.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE nach Laemmli ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld. SDS (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid) ist ein anionisches Tensid, welches an Proteine bindet und somit deren Eigenladung überdeckt. Damit ist eine konstante negative Ladung der Proteine gegeben.

Für die durchgeführten Versuche wurde das „Mini-Protean Tetra Cell“ - System (BIO-RAD, München) verwendet.

Die Auftrennung erfolgte unter Verwendung von Polyacrylamidgelen. Die Stärke der Gele betrug 1,5 mm. Es wurde ein feinporiges 5%iges Trenngel und ein 3,4%iges Sammelgel verwendet. Als Polymerisationsstabilisator und Reaktionsstarter wurden unmittelbar vor dem Gießen 10%iges Ammoniumperoxodisulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) dazu gegeben.

Trenngel 5%

4,18 ml H₂O

1,95 ml Tris- HCL (pH 8,8)

1,25 ml 30% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1); Lösung aus Rotiphorese Gel 40

75 µl SDS; 10% (w/v)

40 µl Ammoniumperoxodisulfat (APS); 10% (w/v)

10 µl TEMED

Sammelgel 3,4 %

3,48 ml H₂O

860 µl Tris-HCL (pH 6,8)

567 µl Acrylamid/Bisacrylamid; 30% (w/v) Lösung aus Rotiphorese Gel 40 (29:1)

47,5 µl SDS; 10% (w/v)

40 µl APS; 10% (w/v)

10 µl TEMED

Vor dem Auftragen der Lysate auf das Gel, mussten die Proben zunächst mit einem Proteinladepuffer (NuPAGE® LDS Sample Buffer, INVITROGEN, Karlsruhe), welcher β-Mercaptoethanol enthielt, für 5 Minuten bei 85°C inkubieren. Dabei wurden die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine, sowie auch bestehende Disulfidbrücken aufgebrochen.

Nach dem Auftragen auf das Gel wurde eine konstante Spannung von zunächst 110 V angelegt, welche nach 15 Minuten auf 160 V erhöht wurde. Dadurch migrierten die Proteine zunächst durch das Sammelgel. Mit Eintritt in das Trenngel wurden die Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt. Sammel- und Trenngel besitzen unterschiedliche pH-Werte und Porengrößen. Kleinere Moleküle liefen dementsprechend im Trenngel schneller, größere Moleküle langsamer. Durch

gleichzeitiges Auftragen eines Molekulargewicht-Standards (*SeeBlue®Plus2 Pre-Stained Standard*, INVITROGEN, Karlsruhe), der ein Proteingemisch aus definierten Proteinen beinhaltet, konnten anschließend die aufgetrennten Proteine hinsichtlich ihrer Größe analysiert werden.

Western Blot

Beim Western Blot werden die aus der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine proteinbindende Nitrozellulosemembran übertragen. Dies geschieht durch das Anlegen eines senkrecht zum Gel befindlichen elektrischen Feldes. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Western Blots kam ausschließlich das *Semidry-Blot-System* (PEQLAB, Erlangen) mit der Apparatur von BIO-RAD zum Einsatz. Dieses wurde wie folgt angeordnet. Auf die Anode wurden in der Reihenfolge drei Lagen Whatman-Papier, eine Nitrozellulosemembran, ein Polyacrylamid-Gel und wiederum drei Lagen Whatman-Papier gelegt. Dabei wurden das Whatman-Papier und die Membran auf die genaue Größe des Polyacrylamidgeles zugeschnitten und vorher in Blotting-Puffer getränkt. Zum Schluss wurde die Kathode aufgelegt und ein konstanter elektrischer Strom von 2 mA/cm² für 2,5 Stunden angelegt.

Immunologischer Nachweis von Proteinen

Um noch freie Proteinbindungsstellen auf der Membran abzusättigen, wurde nach dem Proteintransfer die Membran 30 Minuten mit 0,1% TBS-T mit 5% Magermilch (w/v) inkubiert. Anschließend wurde der Primärantikörper, ebenfalls in 0,1% TBS-T mit 5% Magermilch (w/v) verdünnt, angesetzt, über Nacht bei 4°C auf die Membran gegeben und gleichmäßig geschwenkt.

Um am nächsten Tag noch ungebundenen Antikörper zu entfernen wurde dreimal mit 0,1% TBS-T jeweils 15 Minuten gewaschen. Anschließend wurde der in 0,1% TBS-T mit 5% Magermilch (w/v) verdünnte Sekundärantikörper (1:3000) für 2 Stunden auf die Membran gegeben und bei Raumtemperatur geschwenkt. Die Epitope des Sekundärantikörpers sind spezifisch gegen bestimmte Bereiche des Primärantikörpers gerichtet.

Am Sekundärantikörper ist wiederum Meerrettich-Peroxidase gebunden (horseradish peroxidase, HRP). Nach Anwendung des Amersham™ ECL™Prime-Kits (GE HEALTHCARE LIFE SCIENCE, München) wurde die sogenannte *Enhanced Chemiluminescence* (ECL) aktiv. Das Substrat Lumigen PS-3 wurde durch HRP zu

einem Acridiniumester oxidiert. Dabei entsteht eine Chemilumineszenz mit einer Emission von ca. 430 nm, welche auf einem Autoradiographiefilm, Amersham Hyperfilm ECL (GE HEALTHCARE LIFE SCIENCE, München), detektiert wurde.

Die Filmentwicklung wurde in einer Dunkelkammer durchgeführt. Die Belichtungszeit des Autoradiographiefilmes betrug zwischen 30 Sekunden und 10 Minuten. Anschließend wurde der Molekulargewicht-Standard auf den Film übertragen, um die entstandenen Banden analysieren zu können.

4.2.2 Allgemeine Zellkultivierung

Das Arbeiten mit Zellen, sowie deren Kultivierung erfolgte unter sterilen Bedingungen. Bei allen Zellkulturarbeiten wurden Handschuhe getragen.

4.2.2.1 Kultivierung der humanen HEK293FT-Zelllinie/HT1080-Zelllinie/HeLa-Zelllinie

293FT-Zellen und HT1080-Zellen wurden in DMEM mit 10% (v/v) fetalem Kälberserum (FKS), 2 mM Glutamin und NEAA bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Bei der Kultivierung von HeLa-Zellen wurde DMEM mit EMEM (Earle's, PAA, Parsching, Österreich) ersetzt.

Nach dem Entnehmen der Zellen aus flüssigem Stickstoff, wurden sie zunächst in 75 cm² Zellkulturflaschen mit einer Dichte von 1×10⁶ Zellen/ml ausgesät. Nach ca. 4 Stunden zeigten die Zellen Adhärenz. Das Medium wurde durch 13 ml frisches Komplettmedium ersetzt. Nach einem Tag wurden die Zellen dann in eine 175 cm²-Zellkulturflasche überführt, in welcher die weitere Kultivierung der Zellen in 30 ml Komplettmedium stattfand.

Um die Nährstoffkonzentration konstant zu halten, erfolgte dreimal wöchentlich ein Mediumwechsel. Nach zwei bis drei Tagen (in Abhängigkeit der Konfluenz) wurden die Zellen jeweils passagiert.

Passagieren der Zellen

Nach zwei bis drei Tagen (in Abhängigkeit der Konfluenz (ca. 80%)) wurden die Zellen jeweils passagiert. Nach dem Absaugen des Mediums erfolgte ein kurzer Waschvorgang mit PBS. Um die Zellen vom Zellkulturflaschenboden zu lösen,

wurden 5 ml Trypsinlösung (PAA, Pasching) auf die Zellen gegeben und diese zwei bis drei Minuten inkubiert. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden 5 ml serumhaltiges Kompletmedium zugegeben. Die Zellsuspension wurde abgenommen, zentrifugiert und die Zelldichte nach Zugabe von frischem Kompletmedium und Triturieren mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Definierte Zellzahlen wurden anschließend zur weiteren Kultivierung, oder zum Einsatz in einen experimentellen Ansatz, wieder ausgesät.

4.2.2.2 Präparation hippocampaler Neurone

Vor der Kultivierung primärer Neurone mussten die zu beschichtenden Glasoberflächen für fünf Stunden mit 3% BM behandelt werden. Nach drei anschließenden Waschschrritten mit ddH₂O wurden alle Kultivierungsoberflächen mit PEI beschichtet. Die Beschichtung erfolgte ü.N. bei 37°C. Das PEI wurde am Folgetag zuerst mit ddH₂O, dann mit Kompletmedium ohne B27-Supplement (Waschmedium) gewaschen, bevor anschließend NMEM-B27-Medium für die anschließende Kultivierung der primären Neurone je Konkavität vorgelegt wurde.

Kortikale und hippocampale Neurone wurden aus Embryonen (E17/E18) zeitlich verpaarter, weiblicher Sprague Dawley Ratten gewonnen. Dafür wurde das Muttertier mit CO₂ betäubt und anschließend durch Dekapitierung getötet. Die Entnahme und Dekapitierung der Embryonen aus dem Uterus erfolgte mithilfe einer Bauchdeckenschere und einer Gewebs-Pinzette. Mittels eines Spatels, einer Irisschere und einer gebogenen Pinzette wurden die Schädel der Embryonen geöffnet, die Gehirne isoliert und in eine Petrischale mit vorgewärmtem HBSS Puffer überführt. Die weitere Präparation erfolgte unter Zuhilfenahme eines Binokulars. Zunächst wurde das Zerebellum abgetrennt und die beiden Hemisphären voneinander getrennt. Anschließend konnte mittels einer Skalpellklinge und einer sehr feinen, spitzen und geraden Pinzette der Hirnstamm entfernt werden. Die Meningen wurden vom restlichen Gehirngewebe eliminiert und die Hippocampi mit einer Vannas Federschere präzise herausgeschnitten. Zum Schluss der Präparation erfolgte die Abtrennung der dahinter befindlichen Kortizes. Hippocampi und Kortizes wurden in separaten 15 ml Falcon-Röhrchen, in denen sich vorgewärmter HBSS-Puffer befand, aufgefangen.

Im Anschluss wurden die Hippocampi und Kortizes trypsinisiert. Dafür wurde der HBSS-Puffer aus den 15 ml Falcon-Röhrchen abgesaugt und durch 5 ml Trypsin-

EDTA ersetzt. Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei 37°C wurde dreimal mit 5 ml HBSS-Puffer gewaschen. Im Folgenden wurden 2 ml B27-Medium auf die Hippocampi bzw. Kortizes gegeben, um diese dann mit einer 1000 µl Eppendorf Pipette durch auf- und abpipettieren zu trituiieren. Das B27-Medium wurde anschließend bei beiden Geweben aufgefüllt, beim Hippocampus auf 5 ml und beim Kortex auf 10 ml. Die trituierten kortikalen Zellen wurden außerdem noch filtriert (Filterporengröße: 70 µm).

In einer Neubauer Zählkammer erfolgte anschließend die Bestimmung der Zellzahl und die Einstellung der jeweiligen, für das Zellformat relevanten, Zelldichte für sogenannte *high-density* Kulturen.

Zellformat	Zellzahl
12-Well	$0,8 \times 10^6$
24-Well	$2,5 \times 10^5$
48-Well	$1,5 \times 10^5$
96-Well	$0,5 \times 10^5$

Tab. 15: Übersicht über die Zellzahl bei Aussaat in verschiedene Kultivierungsformate

Der Mediumwechsel von primären Kulturen wurde in zwei- bis dreitägigem Rhythmus durchgeführt. Die Kultivierungsdauer variierte in Abhängigkeit zum jeweiligen Versuchsaufbau.

4.2.2.3 Transfektion mit Lipofectamine 2000™

Für diese Methode des transienten Einbringens von Fremd-DNA in eine Zelle wurde ausschließlich Lipofectamine 2000™ verwendet. Es handelt sich hierbei um eine Mischung aus kationischen Lipiden. Diese werden von der negativ geladenen Plasmid-DNA angezogen, umhüllen diese und fusionieren mit der Zellmembran. Auf diesem Weg gelangt die Fremd-DNA in die Zelle.

Die Transfektion von HeLa-Zellen / HEK293FT Zellen

Der Transfektionsansatz wurde in OptiMEM durchgeführt. Plasmide, die in die jeweiligen Zellen eingebracht werden sollten, wurden in OptiMEM 5 min inkubiert.

Parallel wurde die entsprechende Menge Lipofectamine in einem separaten Eppendorfgefäß zusammen mit OptiMEM inkubiert. Anschließend wurden das Plasmid-OptiMEM-Gemisch und das Lipofectamine-OptiMEM-Gemisch zusammen gegeben und inkubierten weitere 20 min bevor sie auf die zu transfizierenden Zellen gegeben wurden. Der Komplettmediumwechsel fand vier bis sechs Stunden danach statt.

	Zellzahl	Komplettmedium je Well	Waschmedium je Transfektionsansatz	DNA-Menge	Lipofectamine™2000
12-Well	$2,5 \times 10^5$	1000 µl	2 x 100 µl	1,5 µg	2 µl
24-Well	$1,2 \times 10^5$	500 µl	2 x 50 µl	0,8 µg	1 µl
96-Well	$0,5 \times 10^5$	50 µl	2 x 25 µl	0,3 µg	0,3 µl

Tab. 16: Übersicht über die Transfektionsparameter verschiedener Kultivierungsformate von von HeLa-Zellen / HEK293FT Zellen

Virusproduktion als spezieller Fall der Transfektion von HEK293FT-Zellen

Die Zellen wurden in T-175 Zellkulturflaschen kultiviert. 12 Stunden vor der Transfektion wurde das Komplettmedium der Zellen mit 80% Konfluenz durch OptiMEM mit 2% FKS ersetzt. Um zu gewährleisten, dass die Virusproduktion unter serumfreien Bedingungen stattfindet, wurden die Zellen langsam an das serumfreie Medium gewöhnt.

Für die Transfektion wurde ein Transfektionsansatz mit 4 verschiedenen Plasmiden vorbereitet. Neben 18 µg lentiviraler Plasmid DNA wurden 27 µg „Packaging Mix“ (1 µg/µl; pLP1/pLP2/pLP_VSVG = 1/1/1 molares Verhältnis) in 4,5 ml OptiMEM aufgenommen. Parallel wurden in einem separaten Gefäß 108 µl Lipofectamine™ 2000 zu 4,5 ml OptiMEM gegeben. Beide Ansätze inkubierten 5 Minuten bei Raumtemperatur, bevor sie miteinander vermischt wurden und erneut 20 Minuten inkubierten. In dieser Zeitspanne wurden die 293FT Zellen durch 5 ml Trypsin abgelöst und auf eine Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml eingestellt. In einer T-175 Zellkulturflasche wurden schließlich 15 ml OptiMEM vorgelegt und sowohl 7,5 ml der 293FT-Zellsuspension, als auch 9 ml des Transfektionsansatzes dazugegeben. Die Zellen inkubierten über Nacht bei 37°C und 5% CO₂. Am Folgetag wurde das verbrauchte OptiMEM durch 30 ml frisches OptiMEM ersetzt und die Zellen wieder bei 37°C, 5% CO₂ aufbewahrt. 48 Stunden und 72 Stunden nach Transfektionsbeginn wurden die Überstände jeweils in 50 ml Röhrchen überführt und die Zellen gegebenenfalls mit neuem OptiMEM versorgt. Die viralen Überstände wurden bei 3000 x g 5 Minuten zentrifugiert, sterilfiltriert (0,45 µm SFCA-Filter) und

bei -80°C gelagert. Um die viralen Partikel aufzukonzentrieren, mussten die Überstände im Folgenden ultrazentrifugiert werden. Dafür wurden die viralen Überstände aufgetaut und bei $50000 \times g$ für 90 Minuten zentrifugiert und damit pelletiert. Die Überstände wurden verworfen und das entstandene Pellet wurde über Nacht bei 4°C in $50 \mu\text{l}$ 1% BSA/PBS resuspendiert. Die resuspendierten viralen Partikel konnten am Folgetag gepoolt, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt werden.

Transfektion von primären Neuronen

Die Transfektion von zehn Tage alten primären hippocampalen Neuronen fand entweder auf Deckgläsern im 24-Well oder im 96-Well Format statt. Auf die zu transfizierenden Neurone (DIV10) wurde eine bestimmte Menge Kompletmedium gegeben. Der Transfektionsansatz wurde mit Kompletmedium ohne B27-Supplement (Waschmedium) durchgeführt. 4 Stunden nach Zugabe des Transfektionskomplexes auf die Zellen wurde das Medium der Neurone durch Kompletmedium ersetzt.

	Zellzahl	Kompletmedium je Well	Waschmedium je Transfektionsansatz	DNA-Menge	Lipofectamine™2000
24-Well	$2,5 \times 10^5$	500 μl	2 x 50 μl	2 μg	3 μl
96-Well	6×10^4	80 μl	2 x 25 μl	0,5 μg	1 μl

Tab. 17: Übersicht über die Transfektionsparameter verschiedener Kultivierungsformate primärerer Neurone

Der Wechsel des Kompletmediums der Neurone erfolgte jeden dritten Tag. Am siebzehnten Tag wurden die Zellen mit 4% PFA/PBS fixiert (15 min Inkubation bei RT) und mit PBS gewaschen. Anschließend folgten immunzytochemische Verfahren und Lagerung bei 4°C .

4.2.2.4 Immunzytochemische Verfahren

Die Zellen wurden aus dem Brutschrank entnommen. Vorsichtig wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 15 Minuten mit 4% PFA/PBS bei Raumtemperatur fixiert werden konnten. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und direkt im Anschluss mit Blockierungs (1x)- und Permeabilisierungslösung (0,2% BMP/TritonX-100) für 30 Minuten inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe des Primärantikörpers, welcher ebenfalls in 0,2% BMP/TritonX-100 angesetzt war. Der

Primärantikörper inkubierte über Nacht bei Raumtemperatur. Am Folgetag erfolgen zwei weitere fünfminütige Waschvorgänge mit PBS, bevor der Sekundärantikörper für einen Zeitraum von 30 Minuten bei RT auf die Zellen gegeben wurde. Der Sekundärantikörper wurde 1:500 in Blockierungslösung angesetzt. Nach kurzem Waschen mit PBS wurde im Anschluss noch eine Kernfärbung mit dem Farbstoff Hoechst 33258 durchgeführt. Dieser wurde 1:1000 in PBS verdünnt angesetzt und für 5 Minuten bei RT auf die Zellen gegeben. Nach erneutem Waschen konnten die Neurone in PBS aufbewahrt werden.

Die Deckgläser wurden nach der Kernfärbung vorsichtig mit einer Pinzette aus der Kavität herausgenommen, mit Fluoreszenz-Mountingmedium (DAKOCYTOMATION GMBH, Hamburg) auf einem Objektträger positioniert und über Nacht getrocknet.

4.2.3 Stereotaktische Verfahren/lentiviraler Gentransfer *in vivo*

4.2.3.1 Bestimmung der Injektionskoordinaten

Zur Ermittlung der stereotaktischen Koordinaten für juvenile Ratten im Alter von 27 bis 29 Tagen (P27-P29), wurden Tinteninjektionen durchgeführt. Basierend auf den stereotaktischen Koordinaten des Atlas „*The Rat Brain in stereotaxic coordinates*“ (Paxinos, G. und Watson, C.; 1998) wurden die Koordinaten für das Zielgebiet des *Gyrus dentatus* im dorsalen Hippocampus ermittelt (s.u.).

Die Koordinatenbestimmung erfolgte dabei stets ausgehend vom Bregma. Das Bregma ist der Punkt, an dem die *sutura coronalis* und die *sutura sagittalis* zusammentreffen. Von diesem Nullpunkt ausgehend wurden in anterior-posteriorer, medial-lateraler und dorsoventraler Richtung die Koordinaten für die bilaterale Injektion in den *Gyrus dentatus* bestimmt:

	rechte Hemisphäre	linke Hemisphäre
anterior - posterior	-0,39 cm	
medial - lateral	-0,35 cm	+0,35 cm
dorsoventral	-0,36 cm	

Tab. 18: Injektionskoordinaten in den *Gyrus dentatus* 28 Tage alter Raten

Für den shRNA vermittelten *Knockdown* von Neurofascin *in vivo* wurden folgende shRNA-Sequenzen, eingebracht mit Hilfe lentiviraler Vektoren, verwendet (Burkarth, 2008):

shNF252 (shNF1):

5'-GATTGAATGTGAAGCTAAACGAATTTAGCTTCACATTCAATC-3'

5'-GATTGAATGTGAAGCTAAATTCGTTTAGCTTCACATTCAATC-3'

shNF1504 (shNF2):

5'-ACACTCCGATGGTTTAAGACGAATCTTAAACCATCGGAGTGT-3'

5'-ACACTCCGATGGTTTAAGATTCGTCTTAAACCATCGGAGTGT-3'

4.2.3.2 Stereotaktische Injektion lentiviraler Partikel

Vor der Operation wurde mit einer 10 µl Hamilltonspritze das jeweilige Gemisch lentiviraler Partikel aufgezogen und bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert.

Anschließend wurde die Ratte mit einem Gemisch von Ketaminhydrochlorid und Xylazinhydrochlorid (100 mg/kg KG und 10 mg/kg KG) i.p. narkotisiert. Mittels eines Langhaarschneiders erfolgte eine großzügige Rasur des Kopfhaares. Nachdem der Schmerzreflex nach Kneifen in die Hinterläufe ausgesetzt war, wurde die Ratte in den stereotaktischen Rahmen eingespannt, im Bereich der Operationsstelle großzügig mit Vet-Sept desinfiziert und mit Lidocainhydrochlorid (2%) lokal anästhesiert. Mittels eines Skalpell wurde die Kopfhaut in Längsrichtung durch einen Schnitt von ca. 2 cm geöffnet. Mithilfe von Bulldog-Klemmen wurde die Wundöffnung aufgespannt. Nachfolgend konnte die Schädeldecke mit in sterilem PBS getränkten Q-Tipps gesäubert werden.

Nachdem die Hamiltonspritze in die dafür vorgesehene Halterung des Stereotakters (STOELTING EUROPE, Dublin, Irland) eingespannt war, wurden die Injektionskoordinaten in Abhängigkeit der Bregma-Koordinaten berechnet. Mittels eines Bohraufsatzes von 1 mm Durchmesser erfolgte an den berechneten Stellen bilateral die Bohrung durch die Schädeldecke. Die Hamiltonspritze wurde Koordinatengenau positioniert und entsprechend der dorsoventralen Koordinaten in das Gehirn der Ratte abgesenkt. Mit einer Injektionsgeschwindigkeit von 0,2 µl/min wurden 2 – 4 µl virale Suspension je Hemisphäre injiziert. Nach beendeter Injektion verblieb die Injektionsnadel weitere zwei Minuten an ihrer Position, um ein Angleichen des Injektionsdruckes innerhalb des Gehirngewebes zu gewährleisten. Nach dem Entfernen der Injektionsnadel und der Bulldog-Klemmen wurde die

Schädeldecke erneut mit einem PBS-getränkten Q-Tipp gereinigt und die Wundränder erneut mit Lidocainhydrochlorid anästhesiert. Schließlich wurde die Operationsöffnung mit einer Hautnaht verschlossen. Das Tier wurde bis zum Abklingen der Narkose unter einer Infrarot-Wärmelampe beobachtet. Als Analgetikum wurde postoperativ Rimadyl® (4 mg/kg KG) s.c. appliziert.

NF166mt *in vivo*

Den juvenilen (P28), weiblichen Sprague-Dawley-Ratten wurde bei der stereotaktischen OP ein Mischvirus, bestehend aus der NF166mt-Virussuspension (pLenti_Linker_NF166mt) und einer viralen Suspension, welche ein EGFP enthielt (pLentiC04_SEW_miCTR), injiziert. Dieses Mischvirus wurde in dem Verhältnis 1:4 (1 µl EGFP+3 µl NF166mt/Hemisphäre) eingesetzt. Dadurch sollte bei späteren Analysen die Detektion der Infektionsregion ermöglicht werden

4.2.3.3 Transkardiale Perfusion

Die transkardiale Perfusion ist eine Möglichkeit um nach Eintritt des Todes Gewebe möglichst schnell zu fixieren. Die Ratte wurde mit einer Mischung aus Ketaminhydrochlorid und Xylazinhydrochlorid (100 mg/kg KG und 10 mg/kg KG) i.p. in tiefe Narkose versetzt. In Rückenlage wurde das Tier fixiert. Mittels eines Medianschnittes wurde die Peritonealhöhle geöffnet. Durch vorsichtiges Schneiden entlang der Rippenbögen konnte der Thorax geöffnet werden, sodass das Herz zugänglich war. Nach Entfernen des Perikards wurde eine stumpfe Kanüle in den linken Ventrikel eingeführt. Zeitgleich wurde die rechte Herzkammer durch einen Schnitt mit einer Schere geöffnet und die Schlauchpumpe, welche mit der eingeführten Kanüle in Verbindung stand, gestartet. Die Pumpgeschwindigkeit betrug 30-40 ml/min. Zu Beginn wurden ca. 200 ml PBS durch das Tier gepumpt, wodurch das gesamte Blut aus den Gefäßen gespült wurde. Der Schlauch der Pumpe wurde anschließend in 4% PFA/PBS (pH 7,4) überführt, um die Fixierung einzuleiten. Nach maximal 500 ml 4% PFA/PBS wurde die Perfusion beendet, das Tier dekapitiert und das Gehirn frei präpariert. Zur Nachfixierung wurde das isolierte Gehirn für 30 Minuten bei 4°C in 50 ml 4% PFA/PBS gelegt und anschließend bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C in PBS aufbewahrt.

4.2.3.4 Präparation von Hirschnitten mittels Vibratom

Das fixierte und isolierte Gehirn aus Abschnitt 4.2.3.3 wurde vor dem Schneiden am Vibratom zu einem ca. 1 cm langen Block geschnitten, in welchem die potentiell infizierte Region des Hippocampus beinhaltet war. Geschnitten wurde von anterior nach posterior. Dementsprechend wurde das Gehirn mittels eines Sekundenklebers (UHU GMBH & Co. KG, Bühl/Baden) auf der posterioren Seite fixiert und im Vibratom VT1000S (LEICA MIKROSYSTEME VERTRIEB GMBH, Wetzlar) positioniert. Mit einer handelsüblichen Rasierklinge (WILKINSON, Solingen) wurden Schnitte von einer Dicke zwischen 40 µm und 100 µm angefertigt, welche anschließend nach Hemisphären getrennt in PBS und in Well-Platten bei 4°C aufbewahrt, oder sofort immunhistochemischen Verfahren unterzogen wurden.

4.2.3.5 Immunhistochemische Verfahren

Bevor die Gewebeschnitte immunhistochemisch behandelt wurden, musste verifiziert werden, ob die lentivirale Infektion an der richtigen Position im Gehirn stattgefunden hatte. Dafür wurden die Schnitte separat unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Plasmide für die lentivirale Produktion waren meist mit einem EGFP-Epitop versehen. Infizierte Zellen im Gewebe sollten demnach EGFP exprimieren. Aufgrund dessen erfolgte die Identifikation der Infektionsstelle. Bei der Injektion des Neurofascin-Überexpressionskonstruktes wurde ein Gemisch lentiviraler Partikel verwendet, in welchem ein EGFP-exprimierendes Plasmid enthalten war. Dementsprechend relevante Schnitte wurden für die Immunhistochemie verwendet. Dafür wurden die Hippocampus-Schnitte vorsichtig in je eine Kavität einer 96-Well-Platte überführt und zwei bis drei Stunden in Blockierungs (1x)- und Permeabilisierungslösung (0,6% BMP/TritonX-100) inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation des ersten Antikörpers über Nacht bei RT, welcher ebenfalls in 0,6% BMP/TritonX-100 angesetzt war. Am Folgetag wurde dreimal mit PBS für eine Stunde gewaschen, bevor der Sekundärantikörper für einen Zeitraum von zwei bis drei Stunden auf das Gewebe gegeben wurde. Der Sekundärantikörper wurde 1:500 in 0,6% BMP/TritonX-100 angesetzt. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurde im Anschluss noch eine Kernfärbung mit dem Farbstoff Hoechst 33258 durchgeführt. Dieser wurde 1:1000 in PBS verdünnt angesetzt und für 5 Minuten auf das Gewebe gegeben. Nach erneutem Waschen wurden die Hirschnitte vorsichtig

auf einen Glasobjektträger, auf dem sich jeweils ein Tropfen PBS befand, überführt und positioniert. Anschließend wurde das PBS vom Glasobjektträger entfernt. Zum Abschluss wurden die Schnitte mit Fluoreszenz-Mountingmedium (DAKOCYTOMATION GMBH, Hamburg) und Deckgläschen bedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

4.2.4 Auswertung und Statistik

Die statistischen Analysen erfolgten unter Zuhilfenahme des Statistikprogrammes StatView 5.0 (SAS INSTITUTE INC.). Signifikanzen wurden wie folgt definiert. Alle p-Werte $< 0,05$ (*) und $< 0,01$ (**) wurden als signifikant und P-Werte $< 0,001$ (***) als hochsignifikant bezeichnet. Alle Grafiken und Abbildungen der aus dieser Arbeit resultierenden Ergebnisse wurden mithilfe des Programms CorelDraw12 erstellt.

Auswertungen mikroskopischer Aufnahmen hinsichtlich Anzahl, Größe, Volumen und Intensitäten bestimmter Strukturen wurden mithilfe der Bildanalyse-Software ImageJ und Imaris (BITPLANE, Zürich) durchgeführt.

5 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war die Funktion von Neurofascin (NF) hinsichtlich der inhibitorischen Synapsenbildung und -stabilisierung weiterführend zu untersuchen. Dabei sollten Unterschiede zwischen den einzelnen neuronalen Isoformen, sowohl im Hinblick auf ihre Expressionsmuster, als auch in ihrer Funktion *in vitro* und *in vivo* herausgearbeitet werden.

5.1 Expressionsprofile neuronaler Neurofascin-Isoformen *in vitro* und *in vivo*

Burkarth et al. identifizierten neben der bereits bekannten neuronalen NF-Isoform NF186, welche im Besitz einer 5. FNIII-ähnlichen Domäne ist (NF+5^{te}FNIII), eine zweite neuronale Neurofascin-Isoform ohne 5. FNIII-ähnliche Domäne (NF-5^{te}FNIII). NF-5^{te}FNIII wird vermehrt in embryonalem, NF186 stärker in adultem Gewebe exprimiert (Burkarth *et al.*, 2007).

Zunächst sollten diese beiden beschriebenen neuronalen Neurofascin-Isoformen auf ihre Expression in primären hippocampalen Neuronen und in neuronalem Gewebe zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht werden. Für den Nachweis der NF-Expressionen wurden zwei unterschiedliche Primerpaare verwendet.

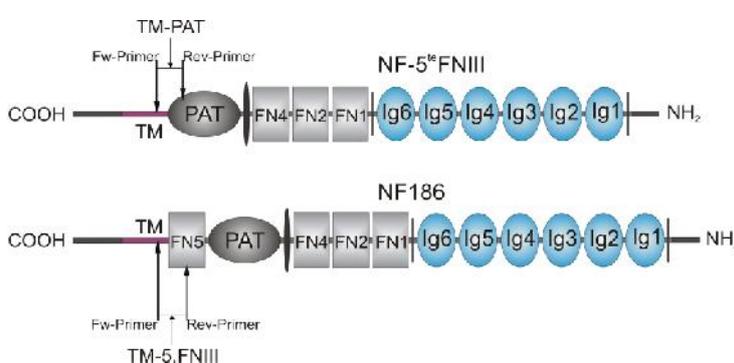


Abb. 5. Schematische Darstellung der NF-Isoformen NF-5^{te}FNIII und NF186 mit den Primer-Paar-Bindungsstellen. Es entsteht jeweils ein Isoform-spezifisches Fragment (TM-PAT/TM-5.FNIII) für die jeweilige NF-Isoform. Diese wurden in qRT-PCRs quantifiziert. FN-Fibronektin-ähnliche Domäne, TM-Transmembrandomäne, PAT-Prolin-Alanin-Threonin-reiche Domäne.

Das Primerpaar für NF186 erkennt die für diese Isoform spezifische Konstellation von 5. FNIII-ähnlicher Domäne in Verbindung mit der Transmembrandomäne (TM-5.FNIII). Das Primerpaar für die Isoform NF-5^{te}FNIII erkennt Teile der PAT-Domäne

und der Transmembrandomäne (TM-PAT), ohne 5. FNIII-ähnliche Domäne (Abb. 5). Somit konnten die beiden Isoformen durch diese spezifischen Primer und die Isoform-spezifischen Fragmente amplifiziert und unterschieden werden. Diese amplifizierten Fragmente stehen in diesem Versuch stellvertretend für die gesamte jeweilige NF-Isoform.

Zuerst wurde die Expression in primären hippocampalen Neuronen, zu den angegebenen Zeitpunkten während der Kultivierung (DIV5-DIV39), untersucht. In Abb. 6 A (unten) ist die relative Expression beider NF-Isoformen dargestellt. Während die Expression der NF-5^{te}FNIII-Isoform mit zunehmender Kultivierungsdauer von einer relativen Expression von 1600 an DIV5 kontinuierlich abfällt, zeigt NF186 mit zunehmender Kultivierungsdauer einen Anstieg in der relativen Expression bis auf einen Wert von 90 an DIV39. Dennoch wird zu allen Zeitpunkten weniger NF186 im Vergleich zur Isoform NF-5^{te}FNIII in den neuronalen Kulturen exprimiert.

In Abb. 6 A (oben) ist das Verhältnis von NF-5^{te}FNIII/NF186 dargestellt. Es wird eine kontinuierliche Reduktion des Expressionsverhältnisses deutlich. Somit werden zusammenfassend eine Abnahme der Isoform NF-5^{te}FNIII und eine Zunahme von NF186 mit zunehmender Kultivierungsdauer festgestellt.

Analog zur *in vitro*-Analyse wurde die relative Expression der beiden NF-Isoformen im Gewebe geprüft. Dafür wurde Gehirngewebe (ohne Zerebellum) von 17 Tage alten (E17) Ratten-Embryonen und von drei Tage alten (P3), 28 Tage alten (P28) und adulten (A) Ratten analysiert und ist in Abb. 6 B dargestellt. Abb. 6 B (unten) zeigt erneut die relative Expression von NF-5^{te}FNIII und NF186. Die Abbildung zeigt einen starken Anstieg der rel. Expression von NF-5^{te}FNIII in embryonalem Gewebe (750) zu P3-Gewebe (2500). Anschließend sinkt die relative Expression von NF-5^{te}FNIII in P28-Gewebe und adultem Gewebe fast unter die Nachweisgrenze (~50). Die rel. NF186 Expression steigt im Gegensatz dazu nach geringer Expression in E17, und P3-Gewebe auf 350 in P28-Gewebe bis hin zu 625 in adultem Gewebe an. Die größte rel. Expression an NF-5^{te}FNIII zeigt sich in P3-Ratten (2500), während die maximale rel. Expression von NF186 in adulten Tieren nur bei ~600 liegt. Junge Ratten exprimieren demnach viel NF-5^{te}FNIII und wenig NF186, während adulte Ratten viel NF186 und wenig NF-5^{te}FNIII exprimieren. Die Expression in P28-Tiere verhält sich ähnlich der Expression von adulten Tieren, wobei weniger exprimiertes NF186 detektiert werden konnte, als in adulten Tieren.

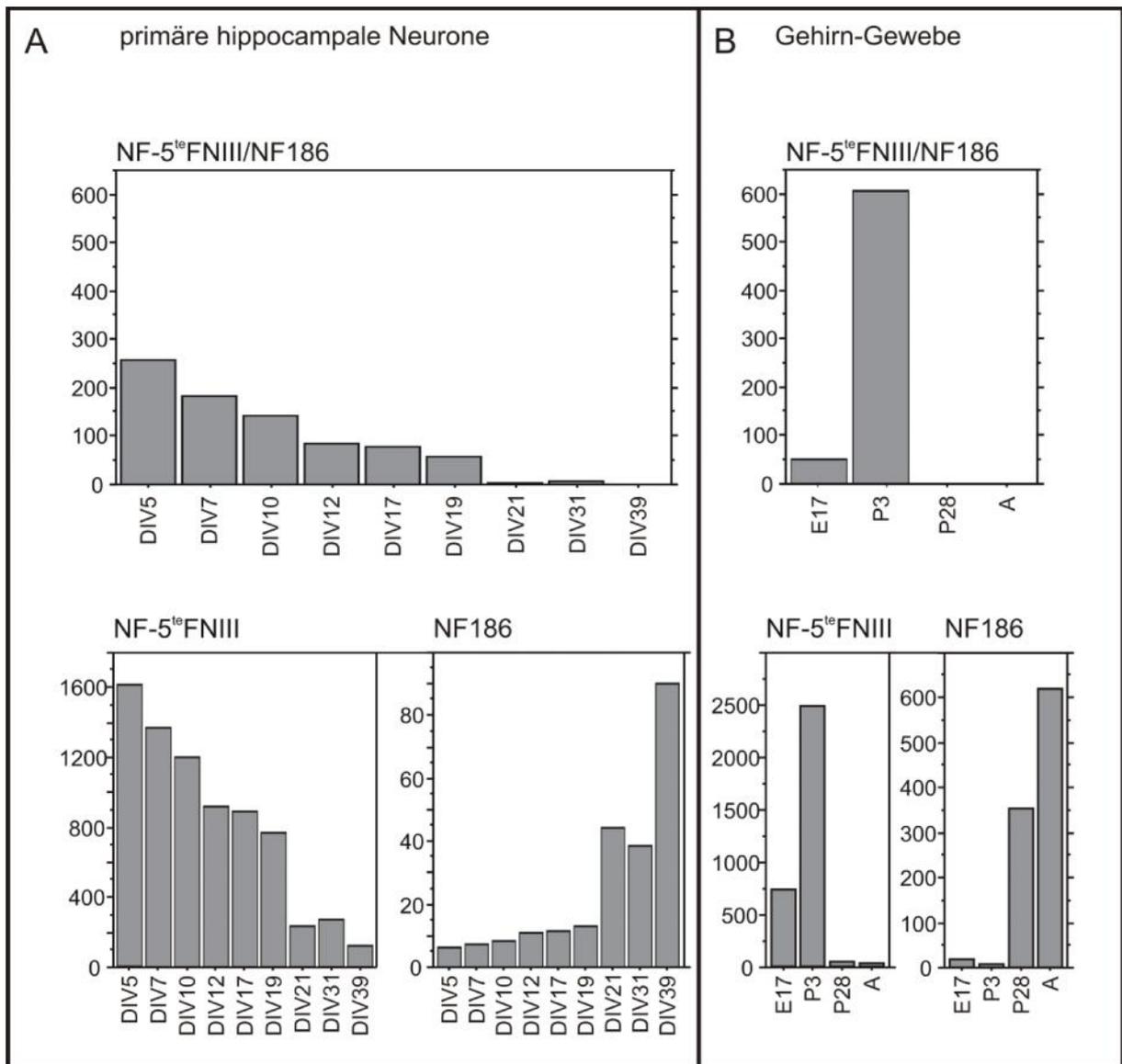


Abb. 6 A. Expression der Isoformen NF-5^{te}FNIII und NF186 in primären hippocampalen Neuronen vom Zeitpunkt DIV5 bis DIV39. Die rel. Expression von NF-5^{te}FNIII nimmt mit zunehmender Kultivierungsdauer kontinuierlich ab, die von NF186 nimmt zu. Es wird zu allen Zeitpunkten mehr NF-5^{te}FNIII als NF186 exprimiert. Das Verhältnis von NF180/NF186 nimmt bis hin zu DIV 39 stark ab.

B. Expression der Isoformen NF-5^{te}FNIII und NF186 im Gehirn-Gewebe der Ratte zu unterschiedlichen Zeitpunkten (17 Tage alte Embryonen (E17), drei Tage alte (P3), 28 Tage alte (P28), adulte (A) Ratten). Nach einem Anstieg der rel. Expression von NF-5^{te}FNIII von E17 zu P3, nimmt die NF-5^{te}FNIII -Expression stark ab. Die Expression von NF186 steigt mit zunehmendem Alter der Ratten.

Das Expressionsverhältnis NF-5^{te}FNIII/NF186. Abb. 6 B (oben) zeigt einen Anstieg bei 17 Tage alten Embryonen zu drei Tage alten postnatalen Ratten und sinkt dann

gegen Null. Adultes Gewebe zeigt demnach ein geringes Expressionsverhältnis NF-5^{te}FNIII/NF186, ähnlich dem Verhältnis von 39 Tage kultivierten primären Neuronen. Demnach haben Gewebe früher Entwicklungszeitpunkte ein hohes NF-5^{te}FNIII/NF186 – Verhältnis, während mit steigender Reife des Gewebes das NF-5^{te}FNIII/NF186 – Verhältnis sinkt. Die primären Neuronenkulturen betrachtend steigt demnach mit zunehmender Kultivierungsdauer der Neurone auch ihr Reifegrad hinsichtlich der Neurofascin-Expression.

5.2 Klonierung und Charakterisierung der NF-5^{te}FNIII-Isoform

Der Unterschied zwischen den Isoformen NF-5^{te}FNIII und NF186 ist das Fehlen einer fünften Fibronektin (III)-ähnlichen Domäne (NF-5^{te}FNIII). Eine solche Spleißvariante wurde bereits von Rathjen et al. 1987 im Huhn beschrieben. Die in E16-Gewebe entdeckte Isoform kommt mit einer hohen Häufigkeit (21%) im Gehirngewebe des Huhns vor (Hassel *et al.*, 1997). Daraus lässt sich ableiten, dass es sich womöglich um dieselbe Neurofascin-Isoform handeln könnte, die von Burkarth et al. im Rattengehirn-Gewebe identifiziert wurde. Aus diesem Grund sollte diese Isoform, mit PAT-Domäne, aber ohne 5. FNIII-ähnliche Domäne kloniert werden.

Die Klonierung erfolgte basierend auf den Isoformen NF22 und NF166 aus dem Huhn, die durch Restriktionsverdau und Ligationen zu der „neuen“ NF-Isoform zusammengesetzt wurden. Anschließend sollte die Molekulare Masse dieser „neuen“ NF-Isoform, in Relation zu den bereits bekannten Isoformen, bestimmt werden.

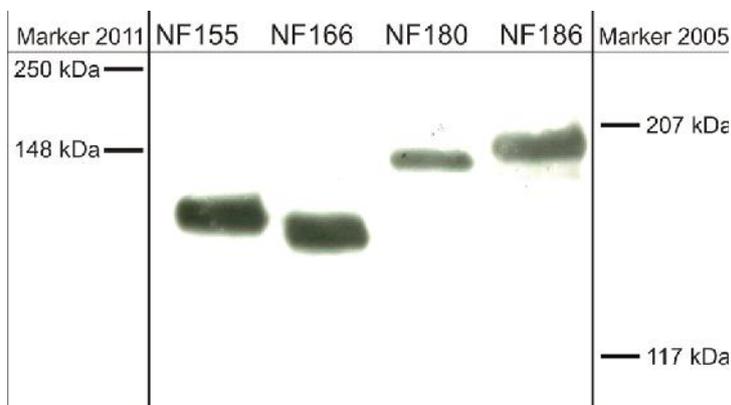


Abb. 7. Western Blot. Dargestellt sind die NF-Isoformen NF155, NF166, NF-5^{te}FNIII (NF180), NF186. Der linke Größenstandard von 2011 zeigte ein anderes Laufverhalten als der Größenstandard von 2005 (Davis *et al.*, 1993, Rathjen *et al.*, 1987).

Durch Überexpression der „neuen“ NF-Isoform, sowie von bekannten NF-Isoformen (NF155, NF166, NF186) in HeLa-Zellen sollte die Molekulare Masse bestimmt werden. In Abb. 7 sind die Proteinbanden der einzelnen Isoformen im Western Blot dargestellt. NF186 weist die größte Molekulare Masse auf, begründet durch seinen Aufbau (vier Fibronectin (III)-ähnliche Domänen und eine PAT-Domäne). Das Fehlen der PAT-Domäne und der fünften Fibronectin (III)-ähnlichen Domäne von Neurofascin 166 zeigt eine erwartete deutlich geringere Molekulare Masse. Die „neue“ Isoform NF-5^{te}FNIII hat ein intermediäres Molekulargewicht, welches sich zwischen dem von NF166 und dem von NF186 einordnet. Die bereits bekannten Molekularen Massen von NF186 und NF166 betragen 186 kDa (Davis & Bennett, 1994) und 166 kDa (Pruss et al., 2006). Betrachtet man die Banden des Größenstandards links aus Abb. 7, stimmen die hier beschriebenen Molekularen Massen nicht mit den bekannten Proteinen des Größenstandards überein. Der Größenstandard zeigt ein apparent abweichendes Laufverhalten zu den beschriebenen Werten für NF166 und NF186. Laut dem linken Größenstandard hätte NF166 eine Molekulare Masse von 130 kDa, NF186 eine von 175 kDa und die neue Isoform eine Molekulare Masse von 163 kDa. Die gliale Neurofascin 155 Isoform wurde als dritte bereits beschriebene Isoform mit in der Western Blot Analyse verwendet. Demnach ist NF155 größer als NF166, aber kleiner als die „neue“ NF-Isoform. Laut des verwendeten Größenstandards ist Neurofascin 155 136 kDa schwer. Aus diesem Grund ist in Abb. 7 ein von Pruss et al. verwendeter Größenstandard zum Vergleich eingefügt worden (Pruss et al., 2006). Die benannten Molekularen Massen 166 kDa und 186 kDa für NF166 und NF186 sind bereits in der Literatur etabliert und wurden basierend auf dem rechten Größenstandard bestimmt. Die Molekulare Masse von der „neuen“ NF-Isoform wurde in Relation zu den etablierten Werten bestimmt.

Die auf diese Weise berechnete Molekulare Masse für NF-5^{te}FNIII aus dem Western Blot beträgt 181 kDa. Deshalb wurde diese Neurofascin-Isoform, ohne 5. FNIII-ähnliche Domäne, als Neurofascin 180 (NF180) bezeichnet. Im Folgenden wird die embryonale Neurofascin-Spleißvariante aus dem Rattengehirn als NF180 bezeichnet. Gemeint ist damit die Isoform ohne 5. FNIII-ähnliche Domäne, aber mit vorhandener PAT-Domäne.

5.3 Wirkung der verschiedenen Neurofascin-Isoformen auf Gephyrin-Aggregat-Formierungen am AIS *in vitro*

In einem neuronalen System sollten die Funktionen der einzelnen NF-Isoformen geklärt werden, um mögliche Unterschiede herauszuarbeiten. Es sollte geklärt werden, ob NF166 nicht nur frühe Entwicklungsvorgänge in der Ansammlung von Gephyrin am Axonhügel reguliert, sondern auch an späteren Mechanismen, insbesondere der Lokalisation von Gephyrin am AIS beteiligt ist.

5.3.1 Neurofascin reduziert endogene Gephyrin-Aggregate

Zuerst sollte die Wirkung von Neurofascin 166 auf endogenes Gephyrin untersucht werden. Dafür wurde NF166 in den dissoziierten hippocampalen Neuronen überexprimiert. Um den richtigen Zeitpunkt für die Transfektion und Fixierung der Neurone zu bestimmen wurde endogenes Gephyrin an DIV10 und DIV17 hinsichtlich seiner Lokalisation in der Zelle untersucht (Abb. 8). Es ist nach 10DIV immer noch im Soma der neuronalen Zellen lokalisiert.

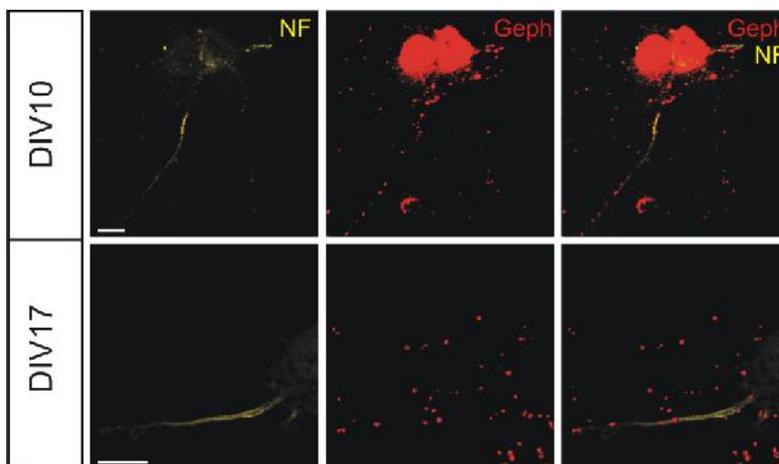


Abb. 8. Neurofascin (NF, gelb) ist an DIV10 und DIV17 neuronaler Kulturen bereits am AIS lokalisiert. Endogenes Gephyrin (Geph, rot) befindet sich an DIV10 hauptsächlich im Soma der Neurone. An DIV17 hat eine Translokation von Gephyrin auf das AIS und die Dendriten stattgefunden. Maßstab 10 μ m.

Nach 17DIV hat eine Translokation von Gephyrin auf das AIS und die Dendriten stattgefunden. Aus diesem Grund wurden die Transfektionen an DIV10 durchgeführt, und anschließend wurden die endogenen Gephyrin-Aggregate hinsichtlich ihrer Größe und Anzahl auf dem AIS und auf den Dendriten an DIV17 analysiert. NF166-transfizierte Zellen wurden mit einem EGFP-N1-Plasmid kotransfiziert und konnten damit identifiziert werden. Die Kontrollen wurden nur mit EGFP-N1 transfiziert.

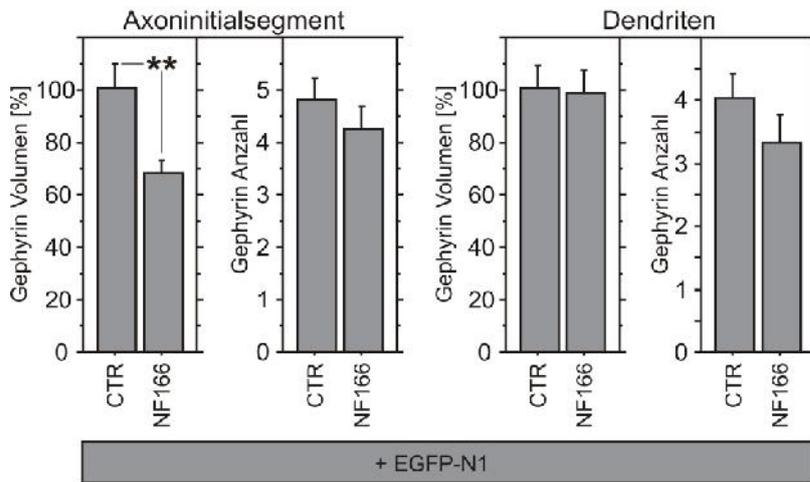


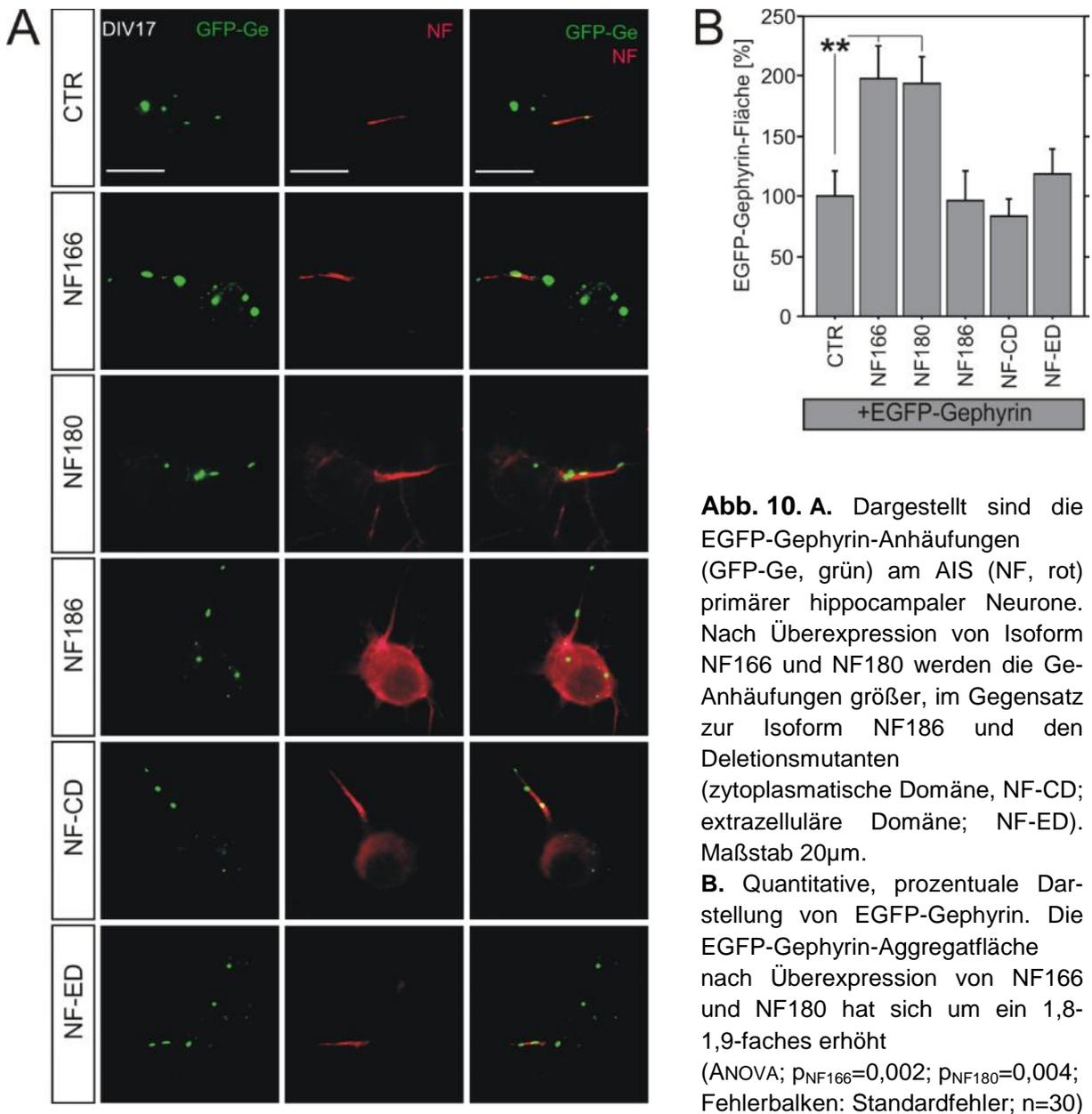
Abb. 9. Endogenes Gephyrin: Dargestellt sind Volumen und Anzahl der Gephyrin-Aggregate in primären hippocampalen Neuronen am AIS und auf Dendriten. Es wurden 20 AIS und 60 Dendriten analysiert. AIS: signifikante Reduktion der Gephyrin-Volumina nach NF166 Überexpression (T-TEST, $p=0,006$, Fehlerbalken: Standardfehler). Dendriten: keine Veränderung. Auswertung: Imaris, Bitplane

Die Analysen der endogenen Gephyrin-Aggregate am AIS aus Abb. 9 zeigen eine Reduktion der Volumina nach Überexpression von NF166 von 100% auf 70% am AIS im Vergleich zu nur EGFP-N1 exprimierenden Zellen (CTR). Die Anzahl bleibt weitgehend unverändert. Untersuchungen auf den Dendriten zeigen im Gegensatz dazu keine Veränderung in der Gephyrin-Anhäufung nach einer NF166-Überexpression, weder im Volumen, noch in der Anzahl. Somit beeinflusst Neurofascin das Aggregieren von Gephyrin am AIS und nicht an den Dendriten. Dies deutet auf einen AIS-spezifischen Effekt von Neurofascin auf Gephyrin hin.

5.3.2 Neurofascin vergrößert exogene EGFP-markierte Gephyrin-Aggregate

Bei der Überexpression von Neurofascin 166 entsteht automatisch ein Ungleichgewicht von viel mehr Neurofascin und viel weniger Gephyrin. Es steht möglicherweise nicht genügend endogenes Gephyrin für die spezielle Funktion mit Neurofascin zur Verfügung. Um den durch die Überexpression hervorgerufenen Überschuss an Neurofascin auszugleichen, wurde EGFP-markiertes Gephyrin (EGFP-Gephyrin) in gleichen Mengen kotransfiziert. Das so entstehende neuronale Testsystem konzentriert sich auf die Funktion der beiden überexprimierten Komponenten zueinander. Diesmal sollte zusätzlich geklärt werden, ob der Einsatz unterschiedlicher neuronaler Isoformen (NF166, NF180, NF186), bzw. nur der

extrazellulären (NF-ED) oder intrazellulären (NF-CD) Domäne von Neurofascin Unterschiede im Aggregationsverhalten von Gephyrin hervorrufen.



Primäre hippocampale Neurone an DIV10 wurden jeweils mit NF166, NF180, NF186, NF-ED oder NF-CD und EGFP-Gephyrin kotransfiziert. An DIV17 folgte die Fixierung, immunzytochemische Behandlung und mikroskopische Analyse. Abb. 10 A zeigt die AIS der transfizierten Neurone. Das kotransfizierte EGFP-Gephyrin (GFP-Ge, grün), wird am AIS exprimiert. Als AIS-Marker wurde Neurofascin

(NF, rot) verwendet. Es wurde die Fläche der EGFP-Gephyrin-Aggregate am AIS analysiert. Bereits aus Abb. 10 A wird eine Vergrößerung der EGFP-Gephyrin-Aggregate nach Überexpression von NF166 und NF180 sichtbar. Die Quantifizierung der Fläche von am AIS aggregiertem EGFP-Gephyrin ist in Abb. 10 B dargestellt. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur EGFP-Gephyrin exprimierten (CTR). Nach Neurofascin-Überexpression wurden die Gephyrin-Aggregate mit denen der Kontrollsituation verglichen. Nach Überexpression von NF166, sowie von NF180 wird eine Vergrößerung der Gephyrin-Aggregate auf 190 bzw. 180% detektiert. Hingegen zeigt die Überexpression von NF-CD, NF-ED und NF186 keinen Effekt auf die EGFP-Gephyrin-Aggregat-Fläche. NF180 zeigt die gleiche Wirkung auf die EGFP-Gephyrin-Aggregate, wie NF166. Demnach haben NF166 und NF180 hinsichtlich der Gephyrin-Assemblierung am AIS die gleiche Funktion. Des Weiteren wird deutlich, dass die zu vornehmlich frühen Zeitpunkten der Entwicklung exprimierten NF-Isoformen einen Effekt auf die Gephyrin-Anhäufung aufweisen, den die hauptsächlich später exprimierte NF186-Spleißvariante nicht zeigt. Außerdem ist weder die zytoplasmatische, noch die extrazelluläre Domäne von Neurofascin 166 ausreichend, um die EGFP-Gephyrin-Aggregat-Größe zu verändern. Somit beeinflussen NF166 und NF180 die Bildung und Formierung von Gephyrin-Aggregaten am AIS *in vitro*.

5.4 Knockdown von Neurofascin *in vivo*

Nachdem Neurofascin 166 und 180 in die Bildung von Gephyrin-Aggregaten am AIS *in vitro* involviert sind, sollte die Funktion von Neurofascin auf synaptische Strukturen am Axoninitialsegment (AIS) *in vivo* untersucht werden. Die *in vivo*-Untersuchungen wurden mittels shRNA-vermittelten *Knockdowns*, lentiviral, im *Gyrus dentatus* von P28-Ratten (weiblich) durchgeführt. Durch die bereits vorhandene komplexe Ausbildung neuronaler Strukturen in den Tieren konnten neben postsynaptischen Strukturen auch präsynaptische Strukturen analysiert werden.

5.4.1 Infektion des Gyrus dentatus in vivo

Vor ihrem Einsatz *in vivo* wurden die lentiviralen Partikel qualitativ analysiert. Die shRNA-exprimierenden Plasmide exprimierten zusätzlich ein EGFP, welches über einen Neuronen-spezifischen Promotor (CamKII-Promotor) gesteuert wurde. Somit konnte keine Titrations in HT1080-Zellen durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurden parallel hergestellte lentivirale Partikel mit einem CMV (Zytomegalievirus)-Promotor für die Titration in HT1080-Zellen verwendet. Ein Virus mit einer Infektionsrate von mindestens 1×10^7 Zellen/ml wurde als hinreichend für die Verwendung *in vivo* definiert. Des Weiteren sollte mit Viruspräparaten, die EGFP unter dem neuronenspezifischen Promotor exprimieren, eine Infektionseffizienz von mindestens 80% (Abb. 11) in neuronalen Kulturen erreicht werden.

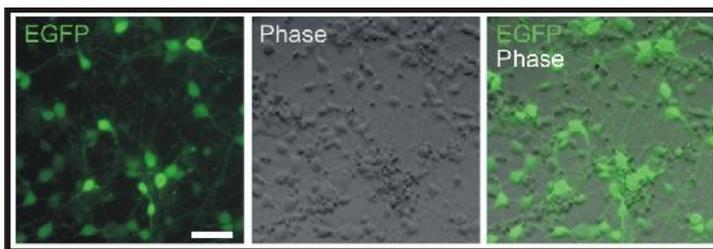


Abb. 11. Fluoreszenzaufnahme von lentiviral (shCTR) infizierten primären hippocampalen Neuronen 7 d nach der Transduktion. Ca. 90% aller Neurone exprimieren EGFP. Maßstab 50 µm.

Diese prävalidierten Viren wurden anschließend in den *Gyrus dentatus* juveniler Ratten injiziert. Das später fixierte Gewebe wurde zunächst hinsichtlich der potentiellen Infektionsstelle untersucht. Aufgrund des EGFP-Signals konnten die infizierten Regionen im *Gyrus dentatus* lokalisiert werden.

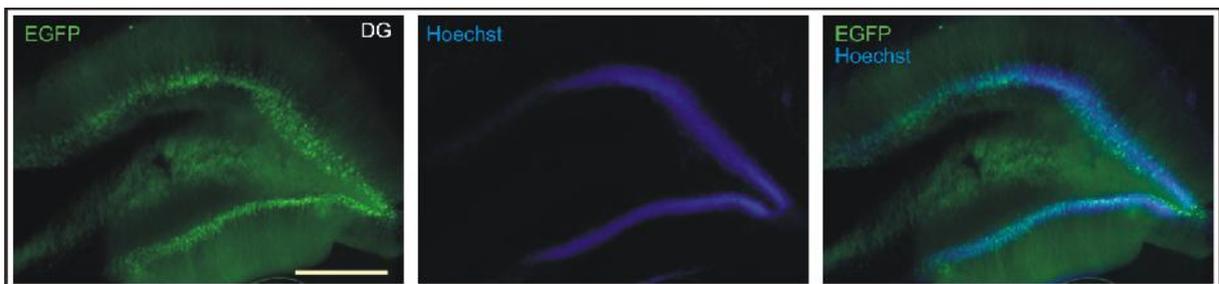


Abb. 12. 80 µm dicker Schnitt durch den *Gyrus dentatus* (DG) einer weiblichen Ratte (OP: P28; Fixierung 14 d postoperativ). EGFP-exprimierende lentiviral infizierte Körnerzellen sind in grün dargestellt. In Blau ist die Kernfärbung mit dem Farbstoff Hoechst dargestellt. Maßstab 500 µm.

Abb. 12 zeigt einen Schnitt durch den infizierten Hippocampus einer P28-Ratte. Wie aus der EGFP-Expression hervorgeht, wurde das gesamte Körnerzellband des Gyrus dentatus infiziert. Aufgrund der Gewebsschnittdicke von 80 µm und einer erhaltenen Anzahl von ca. 20-30 infizierter Schnitte wird eine Ausdehnung der Infektion von 1600 µm-2400 µm in anterior-posteriorer Richtung angenommen. Da die Morphologie der infizierten Neurone aus Abb. 12 unauffällig war und auch die Zellkerne (angefärbt mit Hoechst 33258) keine Veränderungen zeigten, wirkt die Injektion lentiviraler Partikel augenscheinlich nicht schädlich auf die neuronalen Zellen des Körnerzellbandes.

5.4.2 Validierung des shRNA-vermittelten NF-*Knockdowns*

Nachdem die EGFP-Expression im *Gyrus dentatus* verifiziert werden konnte, sollte die Neurofascinexpression nach shRNA-vermitteltem *Knockdown* am AIS untersucht werden. Eine funktionierende shRNA gegen Neurofascin würde die Expression des Neurofascin-Proteins vermindern. Zur Markierung des AIS wurden die AIS-spezifischen spannungsgesteuerten Natriumkanäle (VGSC) mit immunhistochemischen Verfahren visualisiert. Ebenso wurde Neurofascin sichtbar gemacht. Über die Intensität des Neurofascin-Signals am AIS, kann eine Aussage über die Quantität des Proteins am AIS gemacht werden. Um sicherzustellen, dass der Effekt der shRNA gegen Neurofascin (shNF) spezifisch ist und nicht durch die Virusinfektion per se hervorgerufen wird, wurde ebenso eine Kontroll-shRNA (shCTR) injiziert. Diese shCTR ist eine zufällig generierte shRNA, welche zu keinem Abbau bekannter mRNA Sequenzen führt. Demnach sollte exprimiertes Neurofascin unvermindert am AIS vorgefunden werden.

Abb. 13 A zeigt VGSC-markierte AIS von infizierten (EGFP-exprimierend) und nicht infizierten Körnerzellen. Nach Einsatz der shNF kann eine apparente Reduktion des Neurofascin-Signals detektiert werden. Diese Reduktion wird in Geweben von Tieren, die mit einer shCTR infiziert wurden nicht deutlich. Eine Quantifizierung der Graustufenwerte des Neurofascin-Signals ist in Abb. 13 B dargestellt. Die shRNA gegen Neurofascin hat eine Reduktion des Neurofascin-Signals am AIS um 40% zur Folge, während die Kontroll-shRNA nur eine geringfügige Änderung des NF-Signals im Vergleich zu nicht infizierten Zellen aufweist. Damit konnte gezeigt werden, dass durch einen shNF-vermittelten *Knockdown* von Neurofascin nachweislich weniger

Neurofascin am AIS exprimiert wird. Die Transduktion lentiviraler Partikel hat per se keinen Einfluss auf die NF-Signal-Stärke am AIS.

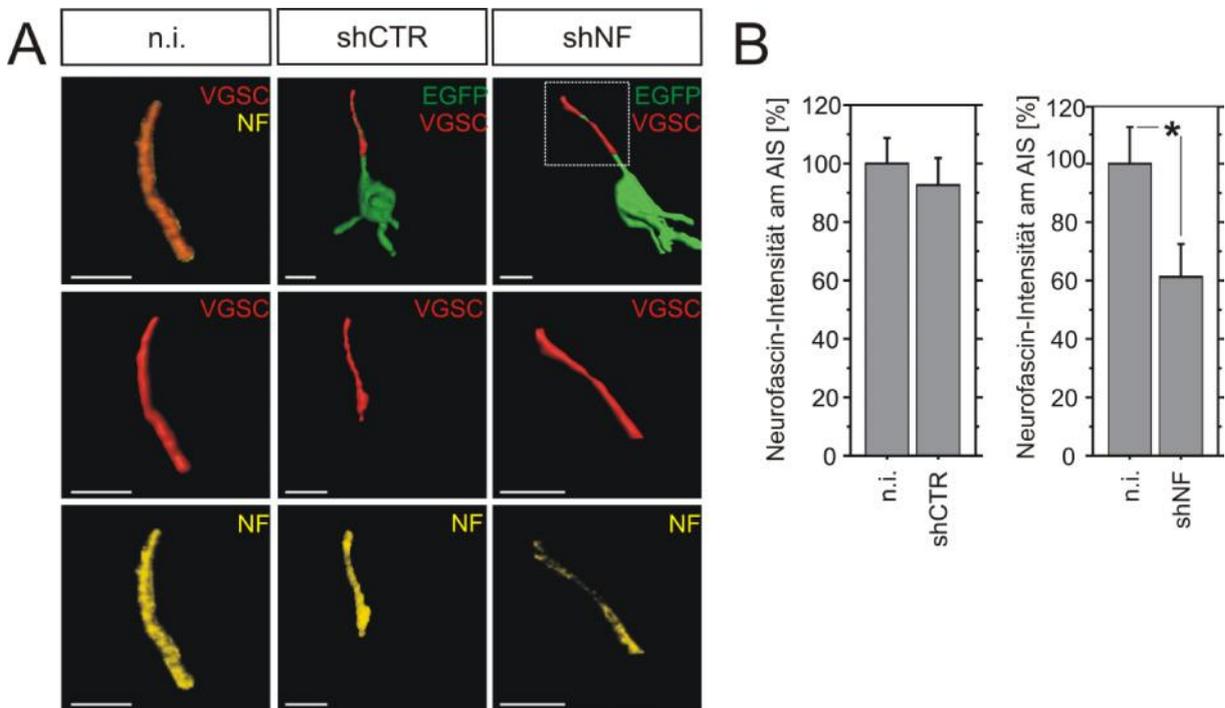


Abb. 13 A. Dargestellt ist die NF-Intensität am AIS. Nebeneinandergestellt sind nicht infizierte (n.i.), shCTR-exprimierende und shNF-exprimierende AIS *in vivo*, visualisiert mittels VGSC (voltage gated sodium channel)-Primärantikörper. Die Neurofascin-Intensität in Gelb wird nach shNF-Expression schwächer.

B. Quantifizierung der Graustufenwerte des NF-Signals am AIS von n.i., shCTR-exprimierenden und shNF-exprimierenden Neuronen in Prozent, normiert auf n.i. Neurone. Die NF-Intensität nach shNF-Expression ist signifikant reduziert (T-TEST, $p=0,03$; $n=20$; Fehlerbalken: Standardfehler).

5.4.3 Verminderte NF-Expression verursacht Reduktion inhibitorischer Strukturen am AIS *in vivo*

Im nächsten Schritt sollten die möglichen Folgen der reduzierten Neurofascin-Expression auf inhibitorische synaptische Strukturen am AIS eruiert werden. Neben Gephyrin, wegen den bereits beschriebenen Effekten von Neurofascin *in vitro*, sollten diesmal auch inhibitorische präsynaptische Strukturen analysiert werden. Ein Marker für präsynaptische Terminale ist GAD65 (Glutamatdecarboxylase). Die AIS wurden wieder immunhistochemisch mittels spannungsgesteuerten Natriumkanal-Antikörper visualisiert. Anschließend konnten GAD65- und Gephyrin-Elemente auf dem AIS analysiert werden. Aufgrund der womöglich zu geringen Auflösung konnten keine

Volumina, sondern nur Anzahlen prä- und postsynaptischer Punkte quantifiziert werden.

Abb. 14 A zeigt die AIS nicht infizierter Neurone, welche infizierten Neuronen gegenübergestellt sind. Die Anzahl der GAD65 (gelb, links) – Punkte auf den AIS betrachtend kann kein Unterschied zwischen nicht infizierten und shCTR-exprimierenden Zellen festgestellt werden. Die Neurone, welche Neurofascin vermindert exprimieren zeigen im Vergleich zu nicht infizierten Neuronen jedoch eine Reduktion in der GAD65-Anzahl am AIS. Auf der rechten Seite in Abb. 14 A ist Gephyrin auf den AIS dargestellt. Ebenso, wie bei GAD65 sind keine Unterschiede zwischen nicht infizierten und shCTR-exprimierenden Neuronen sichtbar. Allerdings wird wieder eine Reduktion von Gephyrin-Punkten am AIS von Neuronen mit verminderter NF-Expression deutlich. Die Quantifizierung dieser sichtbaren Effekte ist in Abb. 14 B dargestellt. Nach der Herunterregulierung der Neurofascin-Expression kann eine Reduktion der GAD65-Punkt-Anzahl am AIS von 70% verzeichnet werden. shCTR-exprimierende Neurone zeigen nur eine 10%ige Reduktion. Die Gephyrin-Punkt-Anzahl der shNF-exprimierenden Neurone zeigt ebenfalls eine Reduktion am AIS, wenn auch nur von 30%. Die shCTR-exprimierenden Neurone zeigen keine signifikante Reduktion der Gephyrin-Anzahl im Vergleich zu nicht infizierten AIS.

Um zu überprüfen, ob der Effekt einer NF-Reduktion auf GAD65 und Gephyrin AIS-spezifisch ist, wurden GAD65 und Gephyrin-Anzahlen ebenso auf den Dendriten neuronaler Zellen miteinander verglichen. shNF-exprimierende Neurone zeigen auf Dendriten eine 20%ige Reduktion, die jedoch keine Signifikanz aufweist. shCTR-exprimierende Neurone zeigen im Vergleich zu nicht infizierten Neuronen keine Reduktion der GAD65- bzw Gephyrin-Anzahl auf den Dendriten. Somit kann kein Effekt der NF-Reduktion auf inhibitorische synaptische Strukturen von Dendriten detektiert werden. Deshalb kann von einem AIS-spezifischen Effekt ausgegangen werden.

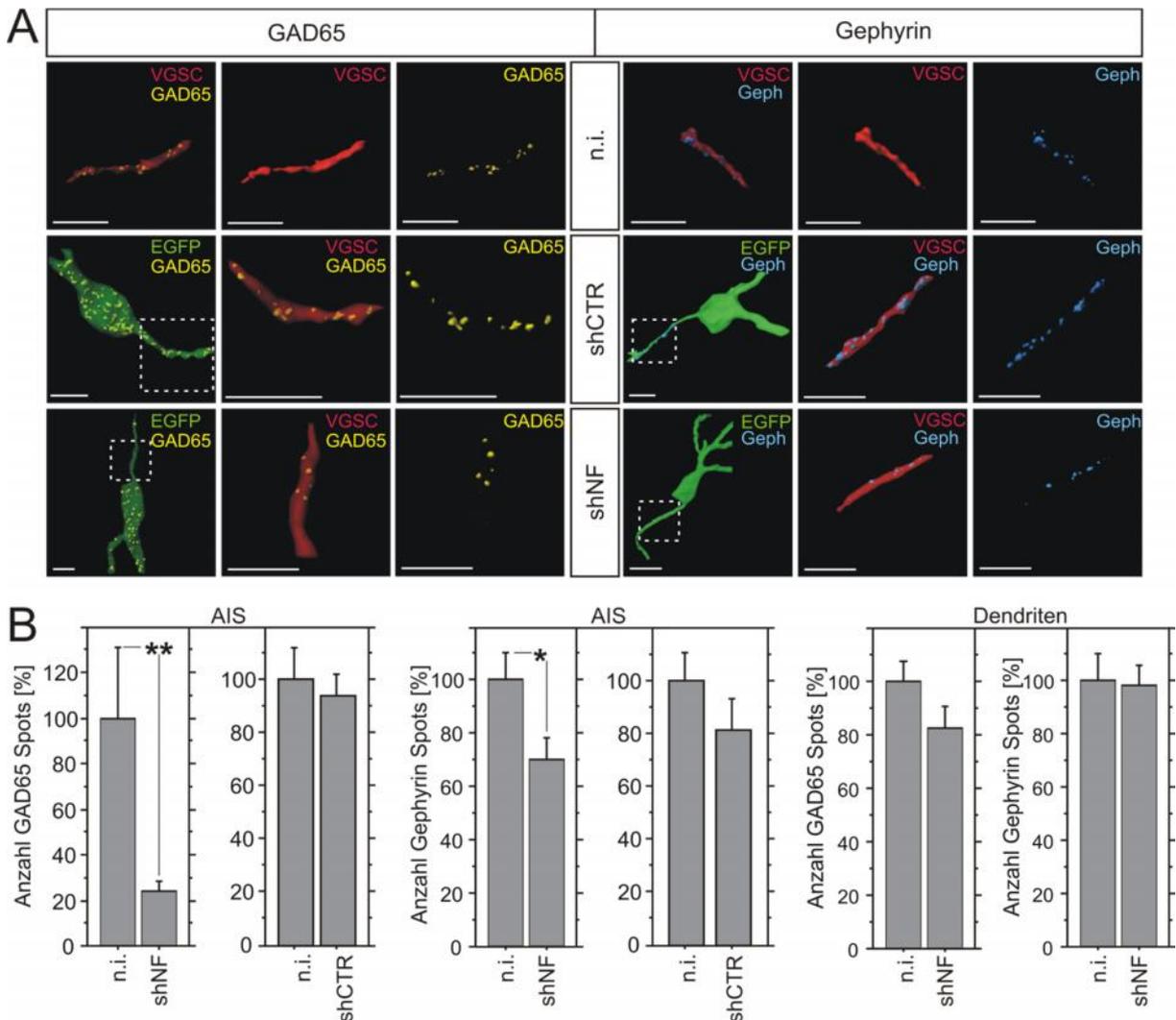


Abb. 14. Gegenüberstellung nicht-infizierter (n.i.) und kontrollinfizierter (shCTR) Neurone *in vivo* mit ihren jeweiligen GAD65 (gelb)- und Gephyrin (blau)-Spots am AIS (VGSC, rot). Maßstab 10 μ m. Die Quantifizierung der Anzahl der Spots am AIS ist im Balkendiagramm (rechts) dargestellt. Es kann kein signifikanter Unterschied in der Anzahl von GAD65- und Gephyrin-Spots/AIS zwischen n.i. und shCTR-infizierten Neuronen festgestellt werden (ANOVA, $p_{\text{GAD65}}=0,7$; $p_{\text{Gephyrin}}=0,2$; Standardfehler). Gegenüberstellung nicht-infizierter (n.i.) und NF-Knockdown-tragender (shNF) Neurone *in vivo* mit ihren jeweiligen GAD65 (gelb)- und Gephyrin (blau)-Spots am AIS (rot) und den Dendriten. Maßstab 10 μ m. Die Quantifizierung der Anzahl der Spots ist in den Balkendiagrammen (rechts) dargestellt. AIS: Sowohl die Anzahl an GAD65- als auch an Gephyrin-Spots ist signifikant reduziert (ANOVA; $p_{\text{GAD65}}=0,0005$; $p_{\text{Gephyrin}}=0,02$). Dendriten: Es kann kein signifikanter Unterschied in der Anzahl von GAD65- und Gephyrin-Spots zwischen n.i. und shCTR-infizierten Neuronen festgestellt werden. Standardfehler.

Aufgrund der verminderten Neurofascin-Expression kommt es zu einer Reduktion der Gephyrin-Punkt-Anzahl am AIS. Deshalb sollte geprüft werden, ob auch GABA_A-Rezeptoren am AIS reduziert auftreten. Eine Untereinheit des GABA_A-Rezeptors ist

die $\beta_{2/3}$ -Untereinheit, welche immunhistochemisch visualisiert werden kann. Die Quantifizierungen der $\beta_{2/3}$ -Untereinheit auf dem AIS und Dendriten, stellvertretend für GABA_A-Rezeptoren, sind in Abb. 15 dargestellt. Verglichen mit shCTR-exprimierenden Zellen und nicht infizierten Zellen kann nach Reduktion der Neurofascin-Expression eine 60%ige Reduktion der GABA_A-Rezeptoren verzeichnet werden. Dieser Effekt ist sogar deutlich stärker als die Wirkung der NF-Reduktion auf Gephyrin am AIS. Auf Dendriten bleibt dieser Effekt wiederum aus. Dies spricht erneut für einen AIS-spezifischen Effekt.

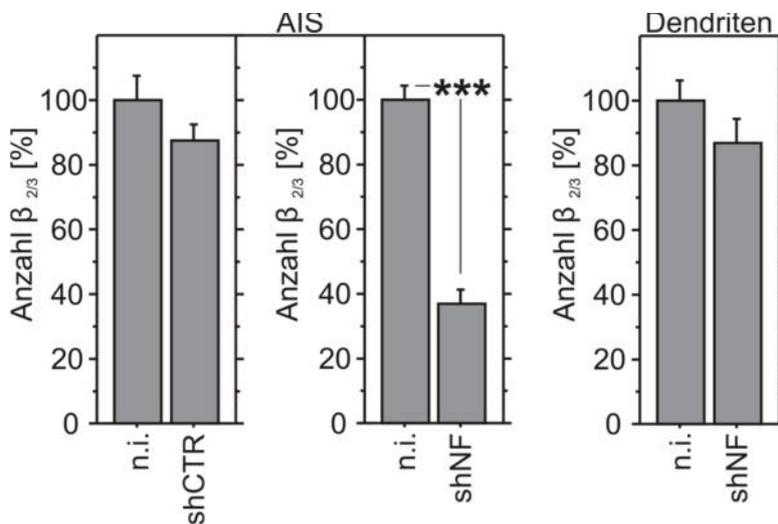


Abb. 15. Quantifizierung GABAerger Anhäufungen ($\beta_{2/3}$) am AIS nicht infizierter (n.i.) und shNF-exprimierender Neurone im *Gyrus dentatus* juveniler Ratten. Im Gegensatz zur Analyse an Dendriten kann am AIS eine hochsignifikante Reduktion (T-TEST; $p < 0,0001$) der Anzahl GABAerger Aggregate nach der Reduktion der Neurofascin-Expression mittels shRNA detektiert werden. Fehlerbalken: Standardfehler.

Zusätzlich wurde eine zweite shRNA gegen Neurofascin (shNF2) eingesetzt, um zu zeigen, dass die durch den Einsatz der ersten shNF verursachten Effekte nicht durch einen zufälligen mRNA-Abbau verursacht wurden, sondern dass die shNF spezifisch gegen Neurofascin gerichtet war. Die Ergebnisse für shNF2-exprimierende Neurone, im Vergleich zu nicht infizierten Neuronen sind in Abb. 16 dargestellt. Durch die shNF2-Expression wird die Anzahl von GAD65 auf 50% und die von Gephyrin auf 40% reduziert. Somit konnte auch mit einer zweiten shRNA gegen Neurofascin ein reduzierender Effekt auf inhibitorische Strukturen am AIS *in vivo* detektiert werden. Dieser war sogar deutlich stärker, als der durch shNF entstandenen Effekte. *Off-Target*-Effekte sind somit unwahrscheinlich. Aus beiden Experimenten wird deutlich, dass Neurofascin einen Effekt auf die Stabilität von inhibitorischen synaptischen Strukturen am AIS *in vivo* hat.

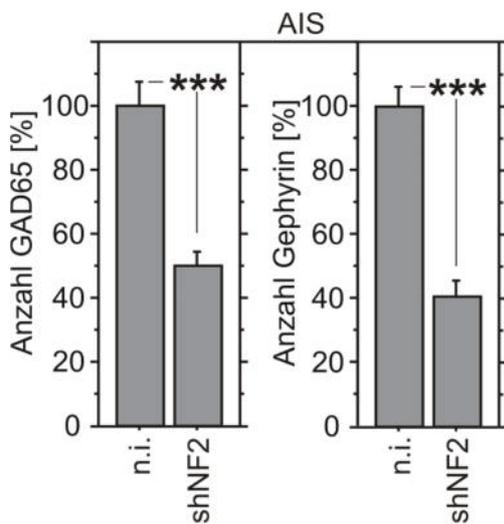


Abb. 16. Quantifizierung der GAD65- und Gephyrin-Punkte am AIS nach Einsatz einer zweiten shRNA gegen NF (shNF2). Es ist eine hochsignifikante Reduktion der Anzahl von prä (GAD65)- und postsynaptischen (Gephyrin) Strukturen am AIS, im Vergleich zu nicht infizierten Neuronen (n.i.), detektierbar (T-TEST, $p < 0,0001$). Damit können mögliche *Off-Target*-Effekte ausgeschlossen werden. Fehlerbalken: Standardfehler.

5.5 Quantitative Expressionsanalyse neuronaler Neurofascin-Isoformen in gestressten Rattengehirnen

Die vorangegangenen Versuche weisen darauf hin, dass Neurofascin an der Gephyrinassemblierung am AIS beteiligt ist. Somit könnte Neurofascin eine wichtige Rolle für die Stabilisierung inhibitorischer Synapsen spielen.

In diversen affektiven Erkrankungen werden Veränderungen synaptischer Aktivitäten beobachtet. Diese Veränderungen werden immer öfter mit Stress, als Auslöser dieser, in Verbindung gebracht. Im Folgenden sollte untersucht werden, inwieweit ein Zusammenhang zwischen der Stressexposition von Ratten und deren Neurofascin-Expression besteht.

Das Projekt wurde in Zusammenarbeit mit der Universität Haifa (Israel) durchgeführt. In Israel wurden drei Rattengruppen mit jeweils acht bis neun männlichen Tieren gebildet. Diese wurden unterschiedlichen Stressparadigmen (Abb. 17) unterzogen. Gruppe „C“ wurde während der gesamten Versuchsdauer keinem Stress exponiert. Die zweite Gruppe „A“ wurde im adulten Alter Verhaltenstests unterzogen, welche als leichte Stressexposition zu werten sind. Die Ratten der dritten Gruppe „JA“ wurden im juvenilen Alter (P28) gestresst und im adulten Alter wie Gruppe „A“ diversen Verhaltenstests unterzogen und somit leichtem Stress exponiert.

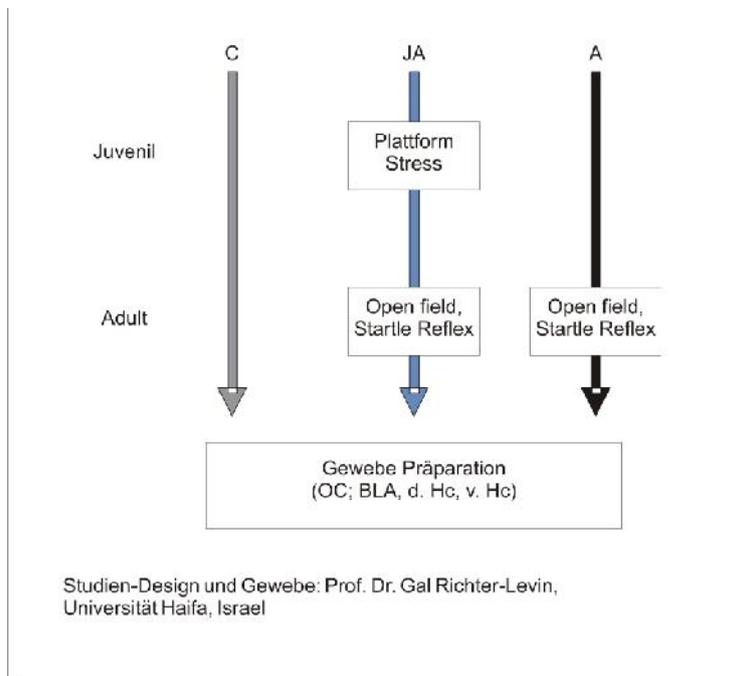


Abb. 17. Drei Rattengruppierungen wurden verschiedenen Stressparadigmen unterzogen. „C“ (grau, keine Stressexposition), JA (blau, Stressexposition in juvenilem und adultem Alter), A (schwarz, Stressexposition im adulten Alter). Folgende Hirnareale wurden präpariert: OC (*Occipitaler* Kortex), BLA (*basolaterale Amygdala*), d. Hc (*dorsaler Hippocampus*), v. Hc (*ventraler Hippocampus*) und zum Zwecke einer RNA-Isolierung, lysiert.

Folgende Gehirnareale der Ratten aller drei Gruppen wurden präpariert: Der *Occipitaler* Kortex (OC) als Kontrollgewebe, das Gewebe der *basolateralen Amygdala* (BLA) und die Gewebe vom dorsalen und ventralen Hippocampus (*Cornu ammonis*, v/d CA; *Gyrus dentatus*, v/d DG). Die Gehirne wurden nach Deutschland überführt.

Nach der RNA-Isolierung der einzelnen Gewebe wurde die mRNA Expression der jeweiligen Neurofascin-Isoform (NF180, NF186) mittels SYBR[®]Green-Analysen quantifiziert (Primer siehe Abb. 5). Im Anschluss an die Bestimmung der Einzelwerte für NF180 und NF186 von jedem einzelnen Tier einer Gruppe (C/JA/A) wurde das Verhältnis der beiden Isoformen zueinander (NF180:NF186) gebildet. Die Mittelwerte aus jeder Gruppe wurden anschließend auf die unbehandelte Kontrollgruppe „C“ normiert.

In Abb. 18 A sind diese Verhältnisse der beiden Neurofascin-Isoformen der einzelnen Rattengruppen im Mittelwert mit Standardfehlern dargestellt. Generell zeigt sich nach adulter Stressexposition (A) eine tendenzielle Abnahme des Verhältnisses NF180/NF186 in allen Geweben. Diese Beobachtungen stehen allerdings unter sehr großen individuellen Schwankungen. Somit kann keine gesicherte Aussage getroffen

werden. Des Weiteren wird aus der Abbildung deutlich, dass weder im Gewebe des *occipitalen* Kortex noch in der basolateralen Amygdala signifikante Veränderungen zwischen ungestressten Ratten und gestressten Ratten beobachtet werden können. Zwar wird im *occipitalen* Kortex in der Gruppe „JA“ eine Reduktion des NF180/NF186-Verhältnisses von 75% im Vergleich zur Gruppe „C“ beobachtet, doch durch die sichtbar hohen Standardfehler kann wiederum keine gesicherte Aussage über diese Beobachtung getroffen werden. In den hippocampalen Geweben des dorsalen und ventralen *Cornu ammonis* (dCA, vCA) und im dorsalen *Gyrus dentatus* (dDG), werden ebenfalls keine signifikanten Veränderungen zwischen den einzelnen Gruppen hinsichtlich der Neurofascin Expression deutlich. Im ventralen *Gyrus dentatus* (vDG) des Hippocampus hingegen wird ein Anstieg des NF180/NF186-Verhältnisses beim Vergleich von adult gestressten Tieren („A“, schwarz) mit juvenil und adult gestressten Tieren („JA“, blau) beobachtet (MANN-WHITNEY-U-TEST; $p=0,01$). Die zusätzliche Stressexposition in juvenilem Alter verändert demnach signifikant die Neurofascin-Expression. Dies weist darauf hin, dass juveniler Stress einen Einfluss auf die Neurofascin-Expression hat.

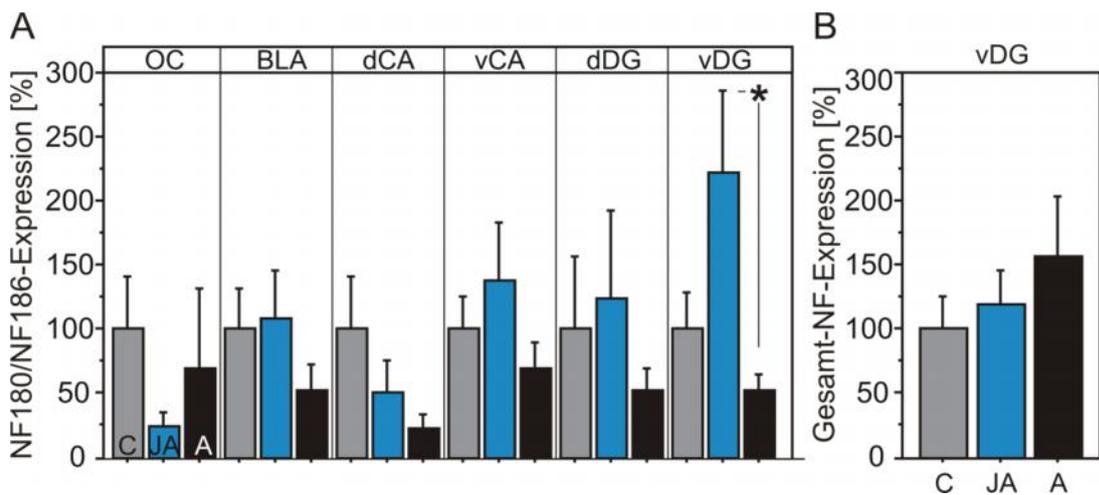


Abb. 18 A. Darstellung der Mittelwerte der Verhältnisse von Isoform NF180 zu NF186 und den dazugehörigen Standardfehlern der 3 Rattengruppen „C“ (grau, nicht gestresst), „JA“ (blau, juveniler+adulter Stress) und „A“ (schwarz, adulter Kontrollstress) innerhalb verschiedener Gehirnaeale (OC (*Occipitaler Kortex*), BLA (*Basolaterale Amygdala*), d/vCA (*dorsales/ventrales Cornu ammonis*), d/vDG (*dorsaler/ventraler Gyrus dentatus*). Im vDG ist ein signifikanter Anstieg des NF180/NF186 Expressionsverhältnisses im Vergleich zur Kontrollstressgruppe „A“ zu verzeichnen (MANN-WHITNEY-U-TEST; $p=0,011$; $n=3-9$, Fehlerbalken:Standardfehler). **B:** Darstellung von Mittelwerten und Standardfehlern von Neurofascin-mRNA-Expressionen.

B: Taqman-Analyse vom vDG. Vergleich der Gesamt-Neurofascin (NF)-Expression im ventralen *Gyrus dentatus* des Hippocampus. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Rattengruppen.

Fehlerbalken: Standardfehler.

Ein Anstieg im Expressionsverhältnis kann aufgrund einer Verschiebung des Spleißverhaltens zwischen NF180 und NF186 entstehen. Dann würde die Gesamtexpression von Neurofascin unverändert bleiben. Es könnte jedoch ebenso ein Anstieg in der Expression von Neurofascin für das ansteigende Verhältnis verantwortlich sein. Diesem Sachverhalt sollte mit dem folgenden Experiment auf den Grund gegangen werden. Durch eine qRT-PCR sollte die Expression aller NF-Isoformen (Gesamt-NF-Expression) bestimmt werden. Dies war durch den Einsatz spezieller Taqman[®]-Sonden möglich. Die Ergebnisse der Taqman[®]-Analyse sind in Abb. 18 B dargestellt. Verglichen wurden erneut die drei verschieden gestressten Rattengruppen „C“, „JA“ und „A“. Es kann nur ein leichter Anstieg der Gesamt-NF-Expression in der Gruppe „A“ im Vergleich zur Gruppe „C“ beobachtet werden. Die drei Rattengruppen unterscheiden sich hinsichtlich ihres Gesamt-NF-Expressionsgehaltes jedoch nicht signifikant voneinander. Dies lässt darauf schließen, dass nicht die Gesamtexpression von Neurofascin durch juvenilen Stress erhöht wird, sondern dass das Expressionsverhältnis von NF180 zu NF186 bei

gleichbleibender Gesamt-NF-Expression Richtung NF180 verschoben wird. Entweder wird mehr NF180, oder weniger NF186 gespleißt. Der Gesamt-NF-Gehalt bleibt durch Stress jedoch unverändert.

5.6 Überexpression von NF166 *in vivo*

Da die Expression der embryonalen Neurofascin-Isoform nach Stress verändert wird, stellt sich im Folgenden die Frage, ob eine erhöhte Expression von Neurofascin 180 Einfluss auf inhibitorische synaptischen Strukturen *in vivo* nimmt. *In vitro* konnte bereits gezeigt werden, dass NF180 sowie NF166 die Gephyrin-Assemblierung am AIS beeinflussen. Inwieweit eine Überexpression *in vivo* inhibitorische Strukturen am AIS beeinflusst, sollte deshalb untersucht werden. Diesmal wurde embryonales Neurofascin mittels lentiviraler stereotaktischer Injektion im *Gyrus dentatus* juveniler Ratten überexprimiert. Dafür wurde mit der Isoform NF166 gearbeitet, da das Protein durch die fehlende PAT-Domäne dieser Spleißvariante kleiner ist. Aufgrund der geringeren Größe lässt sich NF166 leichter in lentivirale Partikel verpacken. Der Neurofascin 166-Isoform wurden zwischen Signalpeptid des Neurofascins und dem Beginn der Ig-Domänen sechs c-Myc-Epitope eingebaut. Somit war es möglich das überexprimierte, exogene (NF166mt) von endogenem Neurofascin *in vivo* zu unterscheiden. Funktionell wurde, wie in Kapitel 5.2.1.2. gezeigt, kein Unterschied zwischen diesen beiden Isoformen NF166 und NF180 *in vitro* verzeichnet.

5.6.1 Expression und Lokalisierung von NF166mt *in vitro*

Zunächst sollte überprüft werden, ob die Integration der c-Myc-Epitope in das Neurofascin-Molekül einen Einfluss auf die Expression und Lokalisation des Neurofascins *in vitro* haben. Dafür wurden dissoziierte hippocampale Neurone mit lentiviralen Partikeln des „NF166mt“'s transduziert. Zehn Tage nach der Infektion wurden die Neurone immunzytochemisch behandelt, ohne die Zellen vorher zu permeabilisieren. Dadurch werden nur die Proteine visualisiert, welche an der Zelloberfläche lokalisiert sind. NF166mt sollte über seine c-Myc-Epitope, mittels eines Primärantikörpers gegen c-Myc, sichtbar gemacht werden. Abb. 19 zeigt eine

Aufnahme dieser beschriebenen immunzytochemischen Färbung. Der Zellkern wurde wiederum mit dem Farbstoff Hoechst 33258 visualisiert.

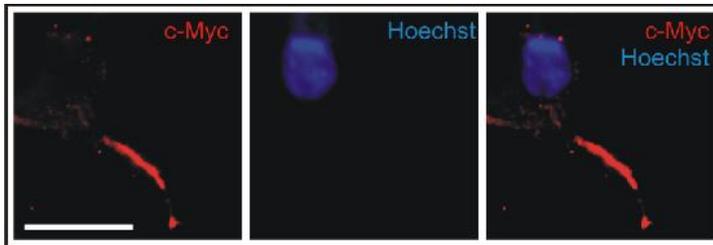


Abb. 19. Darstellung einer Immunzytochemische Färbung primärer, hippocampaler Neurone an DIV 17. Über den Primärantikörper c-Myc (rot) wurde NF166mt an der Oberfläche des AIS lokalisiert. Der Zellkern wurde mit Hoechst 33258 gefärbt. Maßstab 20 μ m.

Die Visualisierung der c-Myc-Epitope macht deutlich, dass exogenes NF166mt an der Oberfläche des AIS exprimiert wird. Demnach verhindern die integrierten c-Myc-Epitope weder die korrekte Expression noch Lokalisation von Neurofascin.

5.6.2 Funktion von NF166mt in HeLa-Zellen und Neuronen

Das HeLa-Zellsystem ist hier ein sehr einfaches System, um die Funktion von Neurofascin zu überprüfen. Aus früheren Experimenten ist bekannt, dass durch die Überexpression von Neurofascin (NF166 sowie NF186) eine Vergrößerung überexprimierter Gephyrin-Aggregate zu verzeichnen ist (Kriebel *et al.*, 2011). Aus diesem Grund sollte geklärt werden, inwieweit die Funktionalität des klonierten Konstrukts (NF166mt) mit der bekannten Funktion des Neurofascin 166, sprich der Vergrößerung postsynaptischer Gephyrin-Aggregate, in HeLa-Zellen übereinstimmt. Des Weiteren sollte ein alleine vom c-Myc-Epitop ausgehender Effekt ausgeschlossen werden.

Dafür wurde ein EGFP-markiertes Gephyrin in HeLa-Zellen überexprimiert. Zusätzlich wurde eine aktive Collybistin-Variante kotransfiziert, um zu gewährleisten, dass das EGFP-Gephyrin an der Oberfläche exprimiert wird. Zusätzlich wurde NF166 überexprimiert. Aus Abb. 20 geht hervor, dass dies zu einer signifikanten Gephyrin-Aggregat-Vergrößerung von 30% führt. Wird NF166mt überexprimiert zeigt dies ebenfalls eine hochsignifikante Vergrößerung der EGFP-Gephyrin-Aggregate von 20%. Um auszuschließen, dass es sich um einen Effekt handelt, der durch die c-Myc-Epitope hervorgerufen wird, sollte EGFP-Gephyrin auch nach Überexpression

eines nur c-Myc-exprimierenden Konstruktes (pCS2+mt) untersucht werden. Aus Abb. 20 wird deutlich, dass die EGFP-Gephyrin-Aggregat-Fläche auf Kontrollniveau verbleibt. Erst durch Integration des NF166 in den pCS2+mt-Vektor (**Zwischenprodukt** der NF166mt-Klonierung – **ZP**) kann eine erneute signifikante Vergrößerung der Gephyrin-Fläche von 10% in HeLa-Zellen erreicht werden. Aus diesem Versuch geht hervor, dass in einem nicht-neuronalen System NF166 und NF166mt gleiche Wirkung auf die Fläche EGFP-markierter Gephyrin-Aggregate aufweisen.

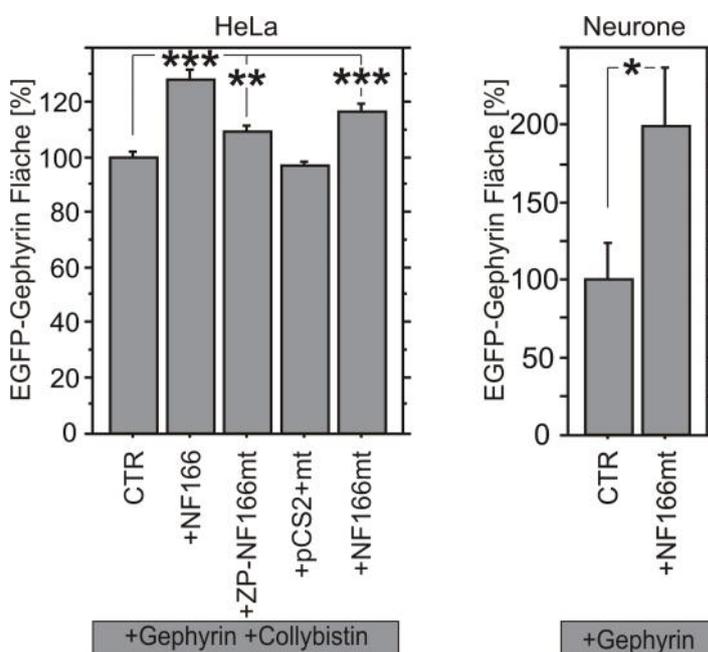


Abb. 20.

HeLa: Quantifizierung der an der Oberfläche befindlichen durchschnittlichen EGFP-Gephyrin-Größen je HeLa-Zelle nach Überexpression von NF166, sowie NF166mt. Negativkontrolle bestehend aus HeLa-Zellen die nur mit EGFP-Gephyrin transfiziert wurden. Der leere pCS2+mt-Vektor zeigt wie auch die Kontrolle (CTR) keinen Effekt. Nach Überexpression der Neurofascin166-Varianten ist die Gephyrin-Aggregat-Fläche signifikant erhöht. ANOVA: $p_{NF166} < 0,0001$; $p_{pCS2+NF166mt} = 0,009$; $p_{NF166mt} < 0,0001$. $n=30$, Fehlerbalken: Standardfehler.

Neurone: Quantifizierung der überexprimierten EGFP-Gephyrin-Aggregate nach zusätzlicher Überexpression von NF166mt. Im Vergleich zur Kontrolle ist die Clustergröße signifikant erhöht. T-TEST: $p=0,04$, $n=30$, Fehlerbalken: Standardfehler.

In dissoziierten hippocampalen Neuronen sollte diese äquivalente Funktion von NF166 und NF166mt weiterführend verifiziert werden.

Hierbei wurde der Versuchsaufbau aus Kapitel 5.3.2. herangezogen. In diesem neuronalen System zeigte sich, dass NF166, aber nicht NF186, die EGFP-markierten Gephyrin-Aggregate am AIS vergrößert. Bei funktioneller Gleichheit sollte das NF166mt die gleiche Wirkung auf die überexprimierten Gephyrin-Aggregate am AIS haben, wie NF166. Aus Abb. 20 wird ersichtlich, dass nach Überexpression von EGFP-markiertem Gephyrin und NF166mt eine Gephyrin-Flächenverdopplung stattgefunden hat. Ebenso konnte eine Verdopplung in der Gephyrin-Aggregat-Größe

nach Überexpression von NF166 in Kapitel beobachtet werden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass sich das NF166mt in seiner Funktion nicht von der NF166-Variante unterscheidet. Die c-Myc-Epitope haben demnach keinen Einfluss auf die korrekte Expression und Funktion des Neurofascins.

5.6.3 NF166-Überexpression *in vivo*

Die korrekte Expression und Funktionalität von NF166mt konnte *in vitro* verifiziert werden. Im Folgenden sollte der Einfluss der embryonalen Neurofascin-Isoform auf inhibitorische synaptische Strukturen *in vivo* untersucht werden. Hierbei wurde das NF166mt-Konstrukt lentiviral in den *Gyrus dentatus* juveniler Ratten injiziert. Parallel wurde ein zweites Lentivirus injiziert, welches ein GFP-Signal in der infizierten Region des Gehirns produzierte. Damit konnte die infizierte Region der fixierten Gehirne 14 Tage nach der OP lokalisiert werden. Nach der Identifizierung der infizierten Schnitte wurden diese immunhistochemisch behandelt. Durch konfokale Laserscan-Mikroskopie konnten Strukturen wie das AIS sowie prä- (GAD65) und postsynaptische Strukturen (GABA_A-Rezeptor-Untereinheit ₂) sichtbar gemacht und quantifiziert werden.

5.6.3.1 Expression von NF166mt am AIS

In vitro konnte bereits gezeigt werden, dass NF166mt am AIS exprimiert wird. Dieser Sachverhalt sollte ebenso *in vivo* überprüft werden. Die am AIS lokalisierten spannungsgesteuerten Natriumkanäle wurden als AIS-Marker verwendet und immunhistochemisch visualisiert. Ebenso wurde das exogene NF166mt mittels Primärantikörper gegen c-Myc-Epitope sichtbar gemacht. Abb.21 zeigt die Kolokalisation des Natriumkanal-Signals (VGSC, blau) mit dem c-Myc-Signal (rot) des NF166mts. Somit konnte die Expression von NF166mt auch *in vivo* bestätigt werden.

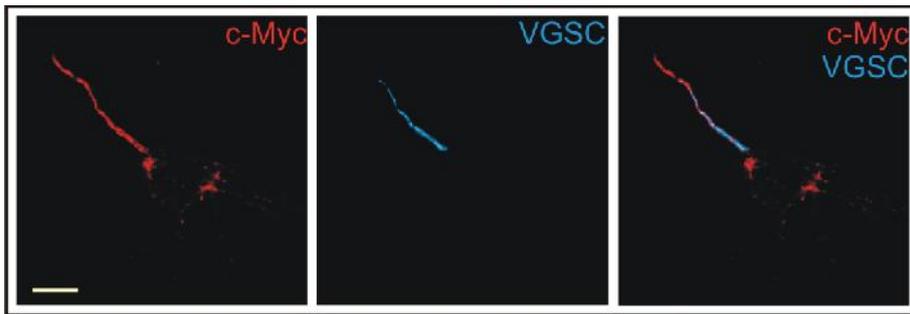


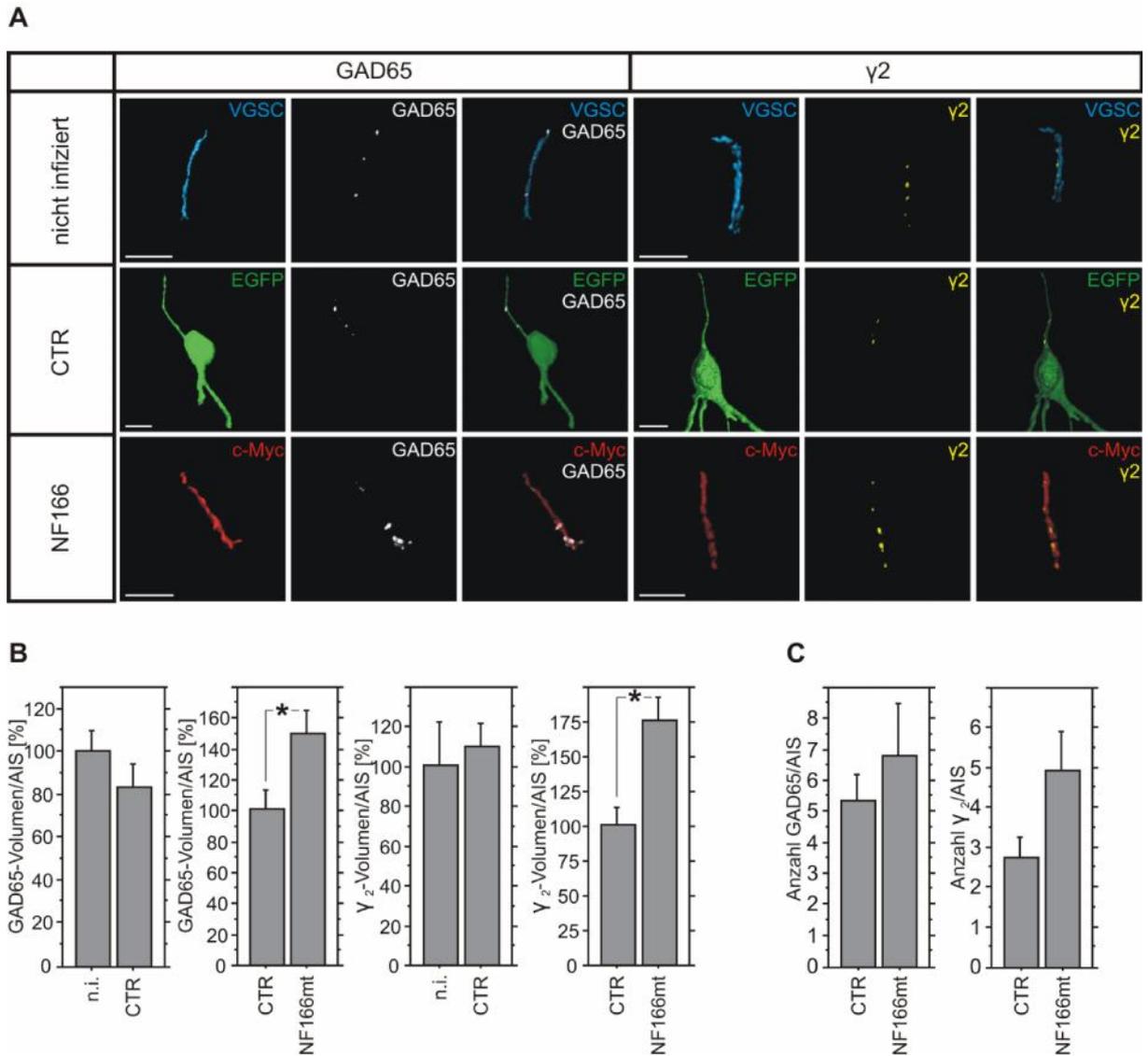
Abb.21. Das überexprimierte Neurofascin mit c-Myc-Epitop (rot) kolokalisiert mit dem Signal für Natriumkanäle (VGSC, blau) und verhält sich somit gleich dem endogenen Neurofascin. Maßstab 10 μm .

5.6.3.2 NF166-Überexpression verändert die Größe inhibitorischer synaptischer Strukturen

Nachdem gezeigt wurde, dass Neurofascin *in vivo* am AIS lokalisiert ist, sollte im nächsten Schritt der Effekt dieser Überexpression auf inhibitorische synaptische Strukturen am AIS *in vivo* untersucht werden. Dafür wurde zur immunhistochemischen Visualisierung des GABA_A-Rezeptors, als postsynaptischer Marker, ein Primärantikörper gegen die Untereinheit des GABA_A-Rezeptors α_2 , gewählt. GAD65 diente wiederum als präsynaptischer Marker. Die AIS wurden wiederum mittels des spannungsgesteuerten Natriumkanal-Primärantikörpers sichtbar gemacht. Zunächst wurden die Anzahlen prä- und postsynaptischer Punkte, äquivalent zum „*Knockdown*-Versuch“ von NF auf dem AIS bestimmt. Die Anzahl variierte jedoch so stark, sichtbar durch den hohen Standardfehler in Abb.22 C, dass keine eindeutige Aussage über mögliche Effekte getroffen werden konnte.

Die höhere Auflösung bei den Aufnahmen mit dem cLSM ermöglichte jedoch eine Volumenanalyse. Somit konnten die Volumina der einzelnen prä- und postsynaptischen Punkte auf dem AIS infizierter Zellen analysiert und mit nicht infizierten AIS verglichen werden. Auf der linken Seite der Abb.22 A sind die GAD65-Volumina (weiß) auf den AIS (VGSC, blau) nicht infizierter Neurone denen auf infizierten (CTR/NF166mt) AIS gegenübergestellt. Das durchschnittliche Volumen nimmt sichtbar zu, nachdem NF166 (c-Myc, rot) überexprimiert wurde. Auf der rechten Seite der Abb.22 A sind die postsynaptischen α_2 -Volumina (gelb) auf AIS nicht infizierter und infizierter AIS dargestellt. Auch hier wird eine sichtbare Volumenvergrößerung deutlich. Die Quantifizierungen dieser Volumina sind in

Abb.22 B dargestellt. Die GAD65-Volumen werden nach Infektion mit dem Kontroll-Virus (CTR) 15% kleiner und die α -2-Volumen nehmen 10% zu. Somit ist kein deutlicher Unterschied zwischen prä- und postsynaptischen Volumina von nicht infizierten und CTR-infizierten Neuronen auf den AIS messbar. Nach der Überexpression von NF166 wird jedoch ein Anstieg der GAD65-Volumina von 50% auf den AIS verzeichnet. Die α -2-Volumina zeigen auf den AIS sogar einen 75%igen Anstieg nach Überexpression von NF166. Diese Ergebnisse sind mit den *in vitro* Daten nach Überexpression von NF166 und Gephyrin vergleichbar. Jedoch entsteht ein Widerspruch mit den Effekten von NF166 auf endogenes Gephyrin *in vitro*, da hier eine Volumenreduktion zu beobachten war. Dennoch scheint eine Überexpression von NF166mt inhibitorische synaptische Strukturen am AIS *in vivo* zu beeinflussen.

**Abb.22.**

A. Darstellung der prä (GAD65, weiß)- und postsynaptischen ($\gamma 2$, gelb) Strukturen am AIS (VGSC, blau). Nach Überexpression von Neurofascins 166 (c-Myc, rot) werden die GAD65- und $\gamma 2$ -Volumen am AIS größer, verglichen mit AIS nicht infizierter (n.i.) und EGFP-exprimierender (CTR) Zellen. Maßstab 10 μm .

B. Quantifizierung der Volumina prä (GAD65)- und postsynaptischen ($\gamma 2$) Spots nach Überexpression von NF166mt. Es ist ein signifikanter (T-TEST; $p_{\text{GAD65}}=0,04$; $p_{\gamma 2}=0,01$) Anstieg des durchschnittlichen Volumens nach NF-Überexpression sowohl von prä- als auch postsynaptischen Spots am AIS zu verzeichnen. Die Volumina von GAD65 und $\gamma 2$ auf dem AIS der EGFP-exprimierenden (CTR) Zellen zeigen keinen Unterschied zu n.i. Zellen. Fehlerbalken: Standardfehler.

C. Quantifizierung der Anzahl prä (GAD65)- und postsynaptischen ($\gamma 2$) Spots nach Überexpression von NF166mt. Aufgrund der starken Schwankung kann keine deutliche Veränderung der Anzahl von GAD65 und $\gamma 2$ auf den AIS nach NF166-Überexpression detektiert werden. Fehlerbalken: Standardfehler.

5.7 Einfluss eines Activin-Rezeptor-Inhibitors auf die NF-Expression *in vitro*

In einem siRNA-HeLa-Screen (Wuchter et al., unpublizierte Ergebnisse) wurde eine siRNA gegen den ACVR2A als wirksam auf Gephyrin-Aggregat-Größen identifiziert. Der Einsatz dieser siRNA reduzierte im HeLa-Zellsystem überexprimierte und an der Oberfläche lokalisierte EGFP-Gephyrin-Aggregate. Der Fragestellung, inwieweit ein Zusammenhang zwischen Activin und Neurofascin besteht, sollte deshalb im folgenden Kapitel nachgegangen werden. In primären Neuronen sollte der Activin-Rezeptor inhibiert werden, um dann das mRNA-Expressionsniveau von Neurofascin zu analysieren. Der hier eingesetzte Inhibitor SB432542 wurde als sehr spezifischer Activin-Rezeptor-Inhibitor für Typ I (ALK_{4/5/7})- Rezeptoren beschrieben (Inman *et al.*, 2002).

Dissoziierte hippocampale Neurone wurden mit 20 µM SB432542 (TOCRIS, Bristol, UK) behandelt und sollten mit unbehandelten Neuronen verglichen werden. Zunächst hinsichtlich ihrer Morphologie, um mögliche apoptotische Effekte des Inhibitors ausschließen zu können.

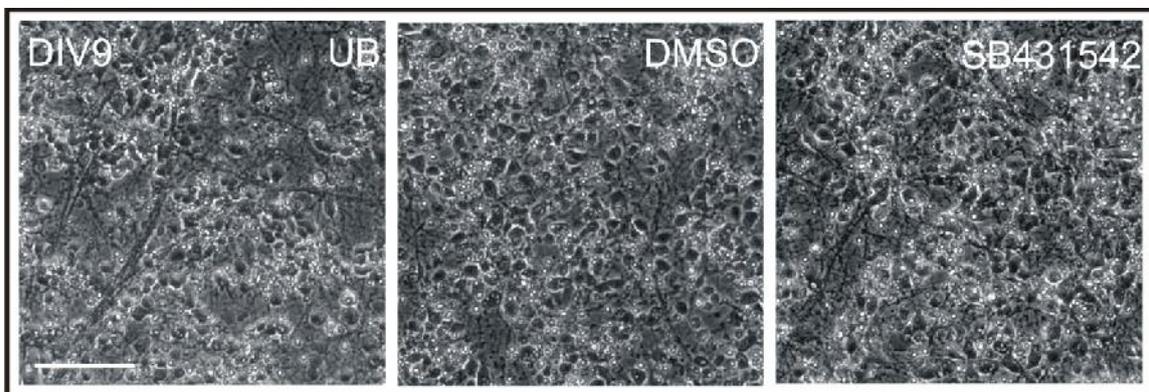


Abb. 23. Primäre hippocampale Neurone (DIV9) 48 h nach Behandlung mit 20 µM SB431542-Inhibitor, DMSO als Lösungsmittelkontrolle und unbehandelte Zellen als Kontrolle (UB). Es können keine morphologischen Unterschiede zwischen unbehandelten und behandelten Zellen beobachtet werden. Die Zellen sind vital. Maßstab 100 µm.

In Abb. 23 sind Phasenkontrast-Aufnahmen primärer hippocampaler Neurone 48 h nach der Inhibitor-Behandlung dargestellt. Die mit dem Inhibitor behandelten Neurone (SB431542) weisen morphologisch keine apparenten Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Neuronen (UB) auf. Auch DMSO, welches zum Lösen des Inhibitor-Lyophilisats verwendet wurde, zeigt keine morphologisch verändernde

Wirkung auf die Neurone. Demnach wirken die eingesetzten Reagenzien nach 48 h nicht apoptotisch auf die primären Zellen.

Im Folgenden wurde die RNA der Neurone isoliert. Mittels qRT-PCR (Taqman[®]) konnten die Expressionsniveaus von Neurofascin und NCAM nach jeweiliger Behandlung detektiert werden. NCAM, als Zelladhäsionsmolekül exzitatorischer Synapsen, sollte hier die Spezifität des Inhibitors auf Neurofascin verifizieren.

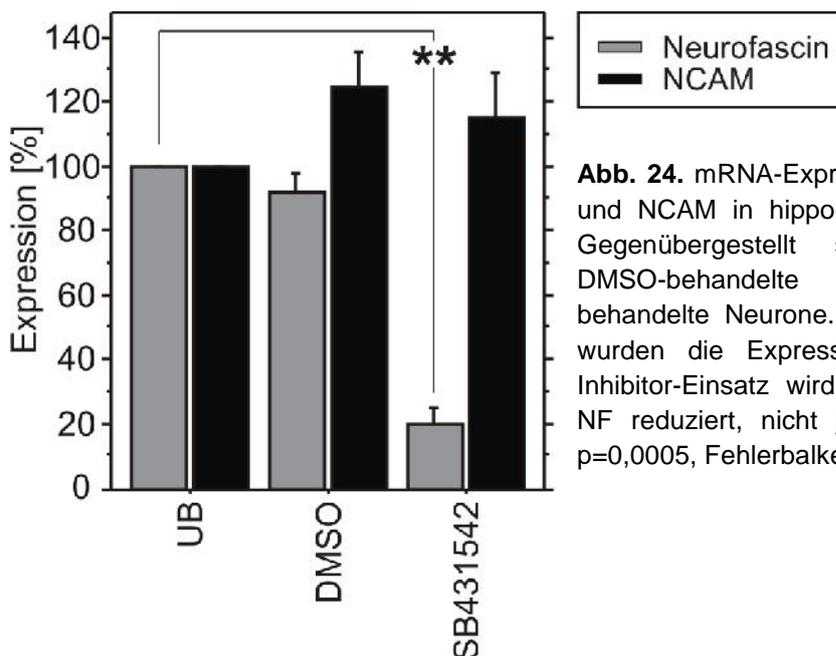


Abb. 24. mRNA-Expression von Neurofascin (NF) und NCAM in hippocampalen Neuronen (DIV9). Gegenübergestellt sind unbehandelte (UB), DMSO-behandelte und SB431542-Inhibitor-behandelte Neurone. 48 h nach der Behandlung wurden die Expression analysiert. Durch den Inhibitor-Einsatz wird die mRNA-Expression von NF reduziert, nicht jedoch von NCAM. ANOVA, $p=0,0005$, Fehlerbalken: Standardfehler.

Abb. 24 zeigt die Ergebnisse der Taqman[®]-Analyse. Dargestellt sind Expressionsniveaus von Neurofascin und NCAM nach SB431542-Behandlung der Neuronen im Vergleich zu unbehandelten Neuronen. Es kann eine hochsignifikanter Reduktion der NF-Expression von 75%, 48 h nach Inhibitor-Behandlung, detektiert werden. Die NCAM-Expression bleibt relativ unverändert dazu. Auch die Lösungsmittelkontrolle DMSO zeigt weder auf die NF-Expression, noch auf die NCAM-Expression einen Einfluss. Damit konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von Activin-Rezeptoren in primären hippocampalen Neuronen eine verminderte Neurofascin-Expression bewirkt. Dies weist darauf hin, dass Activin an der Regulierung der Neurofascin-Expression beteiligt sein könnte.

6 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die weiterführende funktionelle Charakterisierung der neuronalen Neurofascin-Isoformen. Zunächst konnte gezeigt werden, dass die klonierte Neurofascin-Isoform eine Molekulare Masse von ca. 180 kDa hat und damit zwischen den Molekularen Massen der bereits beschriebenen NF-Isoformen NF166 und NF186 einzuordnen ist.

Weiterhin wurde aus Ergebnissen primärer neuronaler Kulturen deutlich, dass hauptsächlich die embryonal-juvenile Isoform NF180 exprimiert wird, deren Expression mit fortschreitender Kultivierungsdauer kontinuierlich abnimmt. Neurofascin 186 wird im Vergleich dazu nur geringfügig exprimiert. Im Gehirngewebe der Ratte kann eine Expressionsdynamik von viel NF180 und wenig NF186 in frühen Entwicklungsphasen hin zu einer geringen NF180- und einer hohen NF186-Expression in juvenilen und adulten Tieren verzeichnet werden.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die embryonalen Neurofascin-Isoformen NF166 und NF180 die Größe von Gephyrinaggregaten am AIS neuronaler Kulturen modulieren. NF186 sowie die eingesetzten Deletionsmutanten konnten keine Veränderung der Gephyrin-Assemblierung hervorrufen. Ebenso vergrößerte NF166 *in vivo* inhibitorische synaptische Strukturen.

Eine shRNA-vermittelte Reduktion der Neurofascinexpression im *Gyrus dentatus* 28 Tage alter Ratten rief hingegen eine Reduktion prä- und postsynaptischer Strukturen am AIS hervor.

Weiterhin zeigten juvenil gestresste Ratten eine veränderte NF180-Expression im ventralen *Gyrus dentatus*.

Eine mögliche Ursache dieser Expressionsregulierung könnte mit Activinrezeptoren zusammenhängen, da die Inhibition dieser auch die Expression von Neurofascin reduziert.

6.1 Modulatorischer Einfluss von Zelladhäsionsmolekülen auf die Gephyrin-Assemblierung an der postsynaptischen Membran

Damit eine komplette Synapse mit direkt gegenüberliegender Prä- und Postsynapse gebildet werden kann, müssen verschiedene Signale gesendet werden, die diese Prozesse initiieren und regulieren. Insbesondere während der Entwicklung werden viele Synapsen neu gebildet und bestehende Synapsen eliminiert, wodurch eine Art strukturelle und funktionelle Plastizität entsteht (Goda & Davis, 2003, Sudhof, 2008). Durch diese Vorgänge spielen inhibitorische Synapsen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Fortleitung von Aktionspotentialen (Miles *et al.*, 1995). Eine Störung im inhibitorischen System stört das Gleichgewicht zwischen Exzitation und Inhibition und kann dadurch zu der Entwicklung psychischer Erkrankungen und affektiver Störungen führen (Fritschy *et al.*, 2008, Sudhof, 2008, Tyagarajan & Fritschy, 2010). Die Assemblierung von GABA_A-Rezeptoren wird generell als Gephyrin unabhängig angesehen, da GABA_A-Rezeptor Anhäufungen ohne Gephyrinaggregation beobachtet werden konnten (Lardi-Studler & Fritschy, 2007). Andererseits können keine alleinigen Gephyrinanhäufungen beobachtet werden. Entsprechend kolokalisieren Gephyrin und GABA_A-Rezeptoren, wobei diese im hexagonalen Netzwerk des Gephyrins an der postsynaptischen Seite verankert werden. (Danglot *et al.*, 2003, Fritschy *et al.*, 2008). Tretter *et al.* konnten sogar eine direkte Interaktion von Gephyrin und der $\alpha 2$ -Untereinheit der GABA_A-Rezeptoren nachweisen, welche von entscheidender Rolle für die Positionierung der GABA_A-Rezeptoren am AIS sein könnte (Tretter *et al.*, 2008, Tretter *et al.*, 2011). Zunächst muss sich jedoch das Gerüstprotein Gephyrin an der postsynaptischen Membran organisieren. Der Transport zur Membran verläuft über die Aktivierung von CDC42 und Collybistin, einem *Rho-Guanine-Nucleotide-Exchange-Factor* (RhoGEF), welcher für CDC42 spezifisch ist (Fritschy *et al.*, 2008, Reid *et al.*, 1999). In den letzten Jahren sind im Zusammenhang mit der Gephyrin-Assemblierung mehr und mehr die Zelladhäsionsmoleküle in den Fokus gerückt. Ein Zelladhäsionsmolekül inhibitorischer Synapsen in perisomalen, dendritischen Bereichen ist beispielsweise Neuroligin 2 (NL2) (Chih *et al.*, 2005, Levinson *et al.*, 2005). Jedlicka *et al.* konnten in NL2-*Knockout* (KO) -Mäusen eine reduzierte Anzahl Gephyrin- und GABA_A-Aggregate auf dem Soma neuronaler Zellen verzeichnen. Die KO-Mäuse zeichneten sich durch einen leichter erregbaren Phänotyp aus (Jedlicka *et al.*, 2011). Weiterhin

kann nach *NL2-Knockout* eine reduzierte inhibitorische synaptische Transmission gemessen werden (Chubykin *et al.*, 2007). NL2 interagiert normalerweise mit Gephyrin und aktiviert Collybistin in perisomatischen Bereichen von Neuronen. Durch den Verlust von NL2 geht die Gephyrin-Assemblierung an der postsynaptischen Membran (Poulopoulos *et al.*, 2009) und somit die Stabilität der GABAergen Synapsen verloren (Yu *et al.*, 2007). Ein weiteres Zelladhäsionsmolekül das an Prozessen inhibitorischer Synapsenbildung und -Stabilisierung beteiligt zu sein scheint, ist ein Vertreter der Ig-Superfamilie, Neuroplastin 65, eines von zwei Isoformen (Neuroplastin 55/65) des Neuroplastins. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Neuroplastin 65 direkt mit den GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 1/2$ interagiert. Durch die shRNA-vermittelte Reduktion der Neuroplastin 65-Expression werden weniger GABA_A- $\alpha 2$ -Strukturen verzeichnet (Sarto-Jackson *et al.*, 2012). Auf ähnliche Weise könnte Neurofascin, welches exklusiv am AIS neuronaler Zellen lokalisiert ist, für die inhibitorische Synapsenstabilisierung am AIS von Bedeutung sein. Dies bestätigt auch eine kürzlich erschienene Arbeit von Zonta *et al.*, bei der NF186 eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung von AIS-Komponenten zugeschrieben wird (Zonta *et al.*, 2011). Die shRNA-vermittelte NF-Reduktion im *Gyrus dentatus* juveniler Ratten zeigte in dieser Arbeit ebenso eine Reduktion von Gephyrin- und GABA_A-Aggregaten am AIS. Die Translokation von Gephyrin und Collybistin an die Zelloberfläche wurde vielfach als Neurofascin-unabhängig beschrieben, indem die durch Collybistin induzierte Oberflächenexpression von Gephyrin in Zellen demonstriert wurde, die kein Neurofascin exprimieren (Saiepour *et al.*, 2010, Tretter *et al.*, 2008). Dennoch könnte Neurofascin zumindest an der Regulierung der Gephyrin-Stabilität am AIS von Bedeutung sein. Eine Rolle für Neurofascin außerhalb des AIS-Bereichs ist eher unwahrscheinlich, da Neurofascin exklusiv am AIS lokalisiert ist. Außerdem zeigte der *Knockdown* von Neurofascin keinen Einfluss auf die dendritischen Strukturen. Ob NL2 oder Neuroplastin 65 für die Gephyrin-Assemblierung am AIS von Bedeutung sind, muss allerdings noch geklärt werden.

Interessanterweise zeigte auch eine Überexpression von Neuroliginen in Neuronen eine Zunahme der synaptischen Dichte, durch Zunahme der Anzahl synaptischer Punkte (Boucard *et al.*, 2005, Chih *et al.*, 2005, Chubykin *et al.*, 2007), sowohl bei exzitatorischen (NL1), als auch inhibitorischen (NL2) Synapsen. Ein möglicher Grund könnten transient stabilisierende synaptische Kontakte sein. Ähnliche Effekte zeigten

sich ebenso in NL-transgen-überexprimierenden Mäusen, deren Anzahl synaptischer Strukturen und somit deren synaptische Dichte, zunahm (Dahlhaus *et al.*, 2010, Krivosheya *et al.*, 2008). Diese Beobachtungen konnten in dieser Arbeit hinsichtlich einer Überexpression der embryonal-juvenilen NF-Isoformen in primären Neuronen verzeichnet werden, allerdings auf die Größe synaptischer Strukturen beziehend. Es zeigte sich, dass die Überexpression von NF166 bzw. NF180 die überexprimierten EGFP-Gephyrin-Aggregate am AIS *in vitro* vergrößerte. Jedoch zeigte weder die Überexpression von NF186 noch die der Deletionsmutanten eine Veränderung der Gephyrinaggregate. Dies deutet auf einen spezifischen Effekt hin und darauf, dass für die Veränderung der Gephyrinaggregat-Größen das komplette embryonal-juvenile Neurofascin-Molekül benötigt wird. Die *in vitro* Daten konnten *in vivo* durch die Überexpression von Neurofascin 166 im *Gyrus dentatus* juveniler Ratten bestätigt werden. Es kam sowohl prä-, als auch postsynaptisch zu einer Größenzunahme inhibitorischer Strukturen. Somit könnte neben bereits bekannten Zelladhäsionsmolekülen wie Neuroliginen auch eine Rolle für NF166 und NF180, welche hauptsächlich embryonal-juvenil exprimiert werden, in der Stärkeregelation synaptischer Verbindungen zugesprochen werden.

Welche Mechanismen dieser Modulation von Gephyrin durch Neurofascin zugrunde liegen, muss weiter untersucht werden. Eine direkte Interaktion von Neurofascin mit Gephyrin konnte bislang weder über die *Yeast Two-Hybrid*-Methode (Harvey, unpubliziert) noch mittels einer Immunpräzipitation (Kirschbaum, unpubliziert) nachgewiesen werden. Beobachtungen im HeLa-Zellsystem zeigten nach Überexpression von NF166 und Gephyrin-Collybistin keine Kolo-kalisation der beiden, sondern vielmehr ein Ausschlussprinzip, bei dem NF nicht an gleicher Stelle wie Gephyrin lokalisiert ist (Kriebel, unpubliziert). Somit scheint Neurofascin nicht im submembranen Gephyrin-Komplex mit eingeschlossen zu sein. Die Gephyrinaggregation könnte demnach auf indirektem Weg moduliert werden.

Hierbei könnte eine Interaktion über den FGFR1-Signalweg von Bedeutung sein. Es ist bereits bekannt, dass die exzitatorische Synapsenformierung und -stabilisierung auf Dendriten über den FGFR-Signalweg reguliert wird, hier allerdings über das Zelladhäsionsmolekül NCAM (Cambon *et al.*, 2004). Dieses gehört der gleichen Ig-Superfamilie von Zelladhäsionsmolekülen an, wie Neurofascin. Auch Neuroplastin 55 als ein weiteres Mitglied dieser Ig-Superfamilie zeigt eine direkte heterophile

Assoziation mit dem FGF-Rezeptor 1 (FGFR1), wodurch Neuritenauswachsen induziert wird (Owczarek *et al.*, 2010).

Bereits Kirschbaum *et al.* beschrieben eine Neurofascin-abhängige FGFR-Signalweiterleitung *in vitro*, die zum Auswachsen von Neuriten führte (Kirschbaum *et al.*, 2009).

Es gibt Hinweise darauf, dass die vergrößerten Gephyrin-Anhäufungen, sowohl in HeLa-Zellen als auch in primären Neuronen, nach Neurofascin-Überexpression FGFR-abhängig reguliert werden. Nach der Überexpression von NF166 nahm die Gephyringröße zu. Bei dem Einsatz eines FGFR-Inhibitors blieb eine Vergrößerung der Gephyrinfläche jedoch aus (Kriebel *et al.*, 2011).

Somit könnte sowohl die inhibitorische als auch die exzitatorische Synapsenbildung und –Stabilisierung über den FGFR-Signalweg reguliert werden.

Vorangehend wurden die postsynaptischen Strukturen in ihrer Bildung und Stabilisierung diskutiert. Da auch präsynaptische inhibitorische Strukturen durch den *Knockdown* bzw. die Überexpression von Neurofascin betroffen waren, wirft dies die Frage auf, ob mögliche transsynaptische Interaktionen involviert sind. Neuroligin interagiert beispielsweise transsynaptisch mit Neurexinen und EphB mit Ephrinen (Dalva *et al.*, 2000, Varoqueaux *et al.*, 2004). Demnach könnte es ebenso Interaktionspartner für Neurofascin auf präsynaptischer Seite geben (mögliche Interaktionspartner von Neurofascin werden in Abschnitt 6.2 beschrieben). Dagegen spricht jedoch die homogene Verteilung des Neurofascins auf dem AIS, da die für transsynaptische Verbindungen bekannten Zelladhäsionsmoleküle meist an bestimmten Stellen der Postsynapse angehäuft und nicht homogen verteilt sind, um auf diese Weise mit ihrem gegenüberliegenden präsynaptischen Liganden zu interagieren (Davis *et al.*, 1994). Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass allein die Destabilisierung bzw. Stärkung des GABA_A-Gephyrin-Komplexes indirekt eine Destabilisierung bzw. Stärkung präsynaptischer Komponenten mit sich zieht.

6.2 Neurofascin 180 im strukturellen und funktionellen Vergleich mit bekannten Neurofascin-Isoformen

Neurofascin wurde erstmals von Rathjen et al. im Huhn erwähnt (Rathjen *et al.*, 1987). Parallel dazu identifizierten Bennett und seine Kollegen ein AnkG-Bindungsprotein, ABGP, welches sich später als Neurofascin herausstellte (Davis *et al.*, 1993). Durch alternatives Spleißen entsteht eine hohe Heterogenität unter den Neurofascin-Polypeptiden. Die drei wichtigsten daraus resultierenden NF-Isoformen im zentralen Nervensystem sind NF186, NF166 und NF155 (Hassel *et al.*, 1997). In dieser Arbeit wurde eine vierte Neurofascin-Isoform definiert, NF180. Diese wurde bereits von Hassel et al. im Huhn identifiziert, wurde dann aber nicht weiter beschrieben. Erst Burkarth et al. identifizierten 2007 ein Neurofascin-Polypeptid, welches strukturell dem NF186 ähnelte, jedoch keine 5. Fibronektin III Domäne aufwies, NF-5te FNIII (Burkarth *et al.*, 2007). NF155 und NF186 sind in Huhn und Ratte strukturell identisch. Demnach wurde unter Einbeziehung der strukturellen Grundlagen von Neurofascin (Hassel *et al.*, 1997) und der Tatsache, dass nach Burkarth et al. eine solche NF-5te FNIII-Form in der Ratte exprimiert wird (Burkarth *et al.*, 2007), diese aus NF166 konstruiert und entsprechend der molekularen Masse als Isoform NF180 bezeichnet.

Diese NF166-ähnliche Isoform weist aufgrund ihrer zusätzlichen PAT-Domäne ein größeres Molekulargewicht auf als die NF166-Isoform. Ansonsten zeigt sie den gleichen strukturellen Aufbau wie NF166. Deshalb ist sie dennoch leichter als NF186, da ihr die 5. FNIII-ähnliche Domäne fehlt. Die PAT-Domäne ist vermutlich O-glykosyliert (Volkmer *et al.*, 1992). Es gibt Hinweise, dass ihr Vorhandensein die Interaktion mit extrazellulären Interaktionspartnern verstärkt (Volkmer *et al.*, 1996).

NF155 wird hauptsächlich in Glia-Zellen und NF186 an den Ranvierschen Schnürringen und dem AIS neuronaler Zellen exprimiert. In früheren Entwicklungsphasen ist Neurofascin auf auswachsenden Neuriten lokalisiert. NF166 wird im peripheren Nervensystem in den Hinterwurzelganglien exprimiert (Hassel *et al.*, 1997). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Neurofascin außerdem am AIS reiferer neuronaler Zellen *in vitro* und *in vivo* exprimiert wird.

Des Weiteren weisen NF180 (NF166) und NF186 unterschiedliche Funktionen auf. Während NF180 (NF166) mit seiner frühen Expression entwicklungsrelevante Mechanismen reguliert, kann NF186 im reiferen System eine stabilisierende Rolle

zugeschrieben werden. Durch die strukturellen Unterschiede zwischen den Isoformen im extrazellulären Bereich werden dementsprechend andere Interaktionspartner adressiert (Basak *et al.*, 2007, Koticha *et al.*, 2005, Pruss *et al.*, 2006). Bisher konnten bereits einige mögliche Interaktionspartner von Neurofascin identifiziert werden, darunter als Komponente der Extrazellulärmatrix (ECM) Brevican (Hedstrom *et al.*, 2007), Tenacin-R, sowie die Zelloberflächenproteine F11/Contactin, Axonin-1 und NrCAM. NrCAM kolokalisiert mit Neurofascin am AIS von Purkinjezellen (Davis *et al.*, 1996), ist mit Neurofascin 166 assoziiert und induziert dadurch das Auswachsen von Neuriten (Volkmer *et al.*, 1998). NF186 bindet wiederum *in cis* an Ranvierschen Schnürringen die β_1/β_3 -Untereinheiten der spannungsgesteuerten Natriumkanäle (Ratcliffe *et al.*, 2001). Unterschiedliche Bindungsaffinitäten konnten außerdem für Axonin-1 beschrieben. Während NF166 eine sehr gute Bindungsaffinität aufweist, zeigt NF186 eine schlechte heterophile Affinität für Axonin-1 (Pruss *et al.*, 2006). Dies deutet wiederum auf unterschiedliche Funktionen der beiden Isoformen hin.

Weiterhin konnten Burkarth *et al.* eine *de novo* Entstehung von Gephyrinaggregaten auf dem Soma von unreifen neuronalen Zellen nach Überexpression von NF166 zeigen, welche nach Überexpression von NF186 ausblieb (Burkarth *et al.*, 2007). Die durch NF180 (NF166) induzierte Gephyrinaggregat-Vergrößerung aus dieser Arbeit und das Ausbleiben der Vergrößerung nach NF186-Überexpression, bestätigen die wohl unterschiedlichen Funktionen der neuronalen Neurofascin-Isoformen NF180/NF166 und NF186.

6.3 Relevanz eines *in vitro* Systems im Vergleich zum *in vivo* System

Primäre neuronale Kulturen können zu den vielfältigsten neurobiologischen Fragestellungen verwendet werden. Sie bieten eine gute Alternative zu einem *in vivo* Versuch. Dennoch stellt sich die Frage nach den Grenzen der Aussagekraft.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass zwei neuronale Neurofascin-Isoformen in der Ratte existieren, deren Expression eine Aussage über die Reife eines Gewebes oder eine Kultur geben kann. Während neuronale Kulturen einen unreifen Status einnehmen, indem sie hauptsächlich die embryonal-juvenile NF-Isoform NF180 exprimieren, konnte im adulten, reifen Gehirngewebe der Ratte eine

überwiegende Expression von NF186 beobachtet werden. Der unreife Zustand einer primären neuronalen Kultur zeigte weiterhin nur partiell ausgebildete prä- und postsynaptische Terminale am AIS (Kriebel *et al.*, 2011).

In dieser Arbeit offenbarten sich widersprüchliche Ergebnisse in zweierlei Hinsicht. Zum einen zeigte die shRNA-vermittelte Reduktion von Neurofascin *in vitro* keine eindeutigen Ergebnisse, *in vivo* jedoch war eine Reduktion der Anzahl inhibitorischer Strukturen am AIS zu beobachten. Zum anderen zeigte die Überexpression von Neurofascin 166 *in vitro* komplett gegenteilige Ergebnisse als *in vivo*. Diese sich widersprechenden Ergebnisse hinsichtlich der Gephyrinaggregat-Größen könnten auf das noch unreife *in vitro* System zurückzuführen sein, welches bestimmte Membrankomponenten noch nicht vollständig ausgebildet hat.

Es ist beispielsweise bekannt, dass bestimmte GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten in unreiferen dissoziierten primären Neuronen weniger stark exprimiert werden als in reiferen Neuronen. Der zeitliche Verlauf dieser Untereinheiten-Expression scheint im Vergleich zur *in vivo* Situation *in vitro* verzögert zu erfolgen (Brooks-Kayal *et al.*, 1998). Ebenso können nur leichte Spuren an Brevican, einem Proteoglykan der Extrazellulärmatrix, in embryonalen Gehirnen detektiert werden, während im adulten reifen Gehirn bis zu 14-fach höhere Mengen an Brevican gemessen werden können, als in neonatalen Gehirnen (Milev *et al.*, 1998).

Ein weiterer Punkt, in dem sich das *in vitro* System von dem *in vivo* System unterscheidet, ist die gliale Expression. Während in neuronalen Kulturen das Gliawachstum durch bestimmte Eigenschaften des Zellmediums unterdrückt wird, ist im reifen Gehirn eine bis zu 50-fach höhere Menge Gliazellen präsent (Hyman, 2005). Die Gliazellen schütten bestimmte Faktoren aus, die für die Entwicklung der Neurone von großer Bedeutung sind. Beispielsweise konnte von Mauch *et al.* gezeigt werden, dass aus Gliazellen stammendes Cholesterin eine wichtige Funktion in der Bildung und Entwicklung von Synapsen einnimmt (Mauch *et al.*, 2001). Um mögliche gliale Effekte einschließen zu können, müssten Ko-Kulturen verwendet werden, oder ein *in vivo*- bzw. *ex vivo*-System.

Alle diese genannten Faktoren spiegeln die Unterschiede eines unreifen *in vitro*-Systems im Vergleich zu einem reifen *in vivo* System wieder.

Es wird deutlich, warum in dieser Arbeit sowohl *in vitro*-Systeme als auch *in vivo*-Systeme verwendet wurden. Fragestellungen zur Funktion auf Gephyrin der entwicklungsrelevanten NF-Isoformen konnten im *in vitro*-System nur teilweise

geklärt werden. Sobald die Bedeutung der später exprimierten neuronalen NF-Isoform NF186 am AIS hinzukam, war ein reiferes System unabdinglich. Ebenso können komplexe Prozesse, wie sie bei Stress im zentralen Nervensystem hervorgerufen werden, in einem simplen *in vitro*-Modell schwer vollständig dargestellt werden, da es nicht möglich ist bestimmte Hirnareale getrennt voneinander zu betrachten.

6.4 Einfluss von Stress auf das zentrale Nervensystem

Der Begriff Stress bezeichnet eine Reaktion des menschlichen Körpers auf spezifische äußere Reize, sogenannte „Stressoren“. Aufgrund dieser Stressoren werden verschiedene Systeme im menschlichen Körper aktiviert. Eine Schlüsselrolle spielt hier die sogenannte „Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse“, die HHN-Achse (**H**ypothalamus-**P**ituitary-**A**drenal-HPA). Neurone des *Nucleus paraventricularis* des Hypothalamus schütten das Corticotropin-*Releasing*-Hormon (CRH) aus. Dadurch wird die Sekretion des Adrenokortikotropen Hormons (ACTH) in der Hypophyse ausgelöst. Dies führt wiederum zur Produktion von Glukokortikoiden in der Nebennierenrinde. Im Nebennierenmark werden parallel dazu außerdem Katecholamine (Adenalin und Noradrenalin) freigesetzt. Die Glukokortikoide regulieren die ACTH- und CRH- Freisetzung durch positive (aktivierende) und negative (hemmende) Rückkopplung, indem sie an ihre Glukokortikoid- (GRs) und Mineralkortikoidrezeptoren (MRs) binden. In der Amygdala beispielsweise wird durch die Bindung an GRs und MRs die HHN-Achse aktiviert. Der Hippocampus und der frontale Kortex wirken der HHN-Achse entgegen (Evans *et al.*, 1989, Feldman & Conforti, 1980, Feldman *et al.*, 1995). Diese Feinregulation wird durch chronisch auftretenden Stress sowie durch Exposition von großen Stressoren in bestimmten Lebensabschnitten gestört (Lupien *et al.*, 2009).

Durch die hohe Anzahl an Glukokortikoidrezeptoren im Hippocampus (McEwen, 1999, Van Eekelen *et al.*, 1988) könnte dieser ein besonderer Angriffspunkt für stress-induzierte Glukokortikoide sein. Tatsächlich wird der Hippocampus mit affektiven Störungen in Verbindung gebracht. Beispielsweise konnte eine Atrophie des Hippocampus nach chronischer Stressexposition, bei Posttraumatischer

Belastungsstörung und bei Depression beobachtet werden (Tsoory *et al.*, 2007, Zhang *et al.*, 2006).

Es gibt Hinweise darauf, dass unter anderem inhibitorische Systeme verändert werden. Demnach könnten GABA und GABA_A-Rezeptoren eine wichtige Funktion bei der physiologischen Reaktion auf Stress und Angst haben. Stress beeinflusst sowohl GABA-Neurotransmitter-Plasma-Level (Vaiva *et al.*, 2004) als auch die Expression verschiedener GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten. Die α -Untereinheit der GABA_A-Rezeptoren ist hierbei von besonderem Interesse. Bis zur frühen postnatalen Entwicklungsstadien der Ratte sind die hervorstechenden α -Untereinheiten α_2 , α_3 und α_5 , während im adulten Entwicklungsstadium ein Wechsel hin zur α_1 Untereinheit stattfindet. Nach Stressexposition von jungen Ratten (P27-29) und hinzukommenden Stressoren im Erwachsenenalter konnte eine Modulation der α -Untereinheiten der GABA_A-Rezeptoren in der Amygdala und dem Hippocampus beobachtet werden (Jacobson-Pick *et al.*, 2008). Juveniler Stress erzeugt hinsichtlich der GABA_A-Rezeptoren eine Veränderung des Reifezustandes, durch ein erhöhtes Vorhandensein der α -Untereinheit (α_2) früherer Entwicklungsstadien.

Es wird deutlich, dass eine Veränderung im Glukokortikoidspiegel durch Stress zur Umgestaltung neuronaler Strukturen und zur Umorganisation und Destabilisierung von Membranproteinen (zum Beispiel postsynaptische Rezeptoren) und einer damit verbundenen Veränderung neuronaler Signaltransduktion führen kann.

Ein weiteres Phänomen, ähnlich dem für GABA_A-Rezeptoren beschriebenen, konnte in dieser Arbeit hinsichtlich der embryonal-juvenilen Neurofascin-Isoform NF180 beobachtet werden. Durch Stressexposition der juvenilen Ratten wird eine Erhöhung der NF180-Expression im ventralen *Gyrus dentatus* hervorgerufen. Dadurch kommt es in dieser Gehirnregion ebenfalls zu einer Veränderung des Reifezustandes, jedoch auf die Neurofascin-Expression bezogen. Die Hochregulation der embryonal-juvenilen NF-Isoform nach Stressexposition geht mit einer möglichen Funktionsänderung einher, da die beschriebene NF180-Isoform für mehr plastische Modellierung synaptischer Strukturen verantwortlich sein könnte. Nach chronischer Stressexposition wird ebenfalls die Hochregulation des Zelladhäsionsmoleküls L1 beobachtet (Sandi *et al.*, 2001, Venero *et al.*, 2002). L1 ist bekannt dafür Neuritenauswachsen zu stimulieren (Schachner, 1997). Die Hochregulation könnte demnach eine neuroprotektive Reaktion auf die Stressexposition darstellen. Ähnlich könnte die Hochregulation der embryonal-juvenilen NF-Isoform durch ihren Einfluss

auf die Gephyrinassemblierung den durch Stress induzierten Veränderungen entgegenwirken. Eine verstärkte Konsolidierung des Erlebten könnte wiederum durch eine erhöhte Inhibition im Bereich des ventralen Hippocampus bewirkt werden (Avital & Richter-Levin, 2005).

Es wird klar, dass molekulare Veränderungen kognitive und emotionale Abläufe beeinflussen können. Durch die veränderte NF-Expression im ventralen Hippocampus, welcher viele Efferenzen zur Amygdala besitzt (Witter, 2007), könnten diese Beeinflussungen erklärt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch chronischen Stress verkürzte apikale Dendriten und weniger stark verästelte Neurone in der CA3-Region des Hippocampus auftreten (Magarinos *et al.*, 1996, McEwen, 1999). Diese Beobachtungen könnten eine Reaktion auf die erhöhte Glutamatfreisetzung sein, um auf diese Weise der möglichen erhöhten Exzitation entgegen zu wirken (Lowy *et al.*, 1993). Ebenso wird die mRNA-Expression des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls NCAM exzitatorischer Synapsen, insbesondere der Isoform NCAM140, nach chronischer Stressexposition von Ratten reduziert (Venero *et al.*, 2002) und könnte in dem Zusammenhang als Folge der erhöhten Glutamatlevel zu verstehen sein. Auf gleiche Weise könnte die veränderte Expression der Neurofascin-Isoformen in dem Zusammenhang ein kompensatorischer Effekt sein. Demnach würde durch eine Verstärkung inhibitorischer Synapsen, der erhöhten Exzitation durch Glutamat entgegengewirkt.

Es ist bekannt, dass erlebter Stress in einer frühen Lebensphase und wiederholter Stress im Erwachsenenalter die Vulnerabilität für die Entwicklung von sowohl depressiven Symptomen als auch von Angsterkrankung bewirken (Tsoory *et al.*, 2007). Dies weist darauf hin, dass durch die Stressexposition im juvenilen Alter (P27-P29) möglicherweise molekulare Veränderung stattgefunden haben, welche von solch profundem und langanhaltendem Charakter sind, dass sie zu einen veränderten adulten Phänotyp führen (Avital *et al.*, 2005, Isgor *et al.*, 2004). Demnach könnten Zelladhäsionsmoleküle eine entscheidende Rolle bei den beschriebenen Prozessen spielen, da sie eine wichtige Bedeutung für die Synapsenbildung und -Stabilisierung haben (Sandi *et al.*, 2004, Dahme *et al.* 1997; Gascon *et al.* 2007; Kriebel *et al.* 2011).

Somit könnten jene tiefen Veränderungen mit einer möglichen inhibitorischen Synapsenverstärkung, eben durch eine veränderte Neurofascin-Expression, zusammenhängen.

Aus diesem Grund wurden alle *in vivo* Versuche in dieser Arbeit an juvenilen Tieren durchgeführt. Dies lässt den späteren Vergleich zu, ob die strukturellen Veränderungen durch *Knockdown* oder Überexpression von Neurofascin mit durch Stress hervorgerufenen molekularen Veränderungen vergleichbar sind. Inwieweit bestimmte molekulare Veränderungen die Entwicklung einer posttraumatischen Belastungsstörung fördern, muss in weiteren Analysen untersucht werden. Beispielsweise könnten gestresste Tiere hinsichtlich ihrer synaptischen Strukturen am AIS analysiert werden. Eventuell ließen sich Parallelen zur shRNA-vermittelten NF-Reduktion bzw. Überexpression von Neurofascin 166 finden.

Der Einfluss von Stress zeigt sehr heterogene Effekte. BDNF (brain-derived neurotrophic factor) wird beispielsweise ebenso eine Rolle in Stress-induzierten affektiven Störungen zugeschrieben. Demnach sinken die BDNF-Konzentrationen im Hippocampus von Ratten, welche nach der Geburt von ihrer Mutter getrennt wurden. Warum Stress die Reduktion von BDNF bewirkt, gilt es zu klären (Roceri *et al.*, 2002). Eine weitere Verbindung von molekularen Veränderungen und Angsterkrankungen besteht in einem Mitglied der TGF- β -Familie. Activin wird stark verbreitet im ZNS exprimiert und ist unter anderem für die neuronale Entwicklung von Bedeutung (Trudeau *et al.*, 1997). Dennoch ist über die Rolle von Activin im ZNS recht wenig bekannt. Jüngst konnten Verbindungen zu inhibitorischen Prozessen und Activin aufgedeckt werden. Activin wird beispielsweise im Zusammenhang mit Angsterkrankungen und GABA_A-Rezeptoren erwähnt. Transgene Mäuse, die durch einen dominant-negativen Activinrezeptor verändert wurden, zeigten eine verstärkte GABA-Freisetzung und postsynaptische Inhibition der GABA_A-Rezeptoren im Hippocampus. Dies resultierte im Verhaltenstest in einem weniger ängstlichen Phänotyp (Zheng *et al.*, 2009). Zu einem komplett unterschiedlichen Ergebnis kam die Gruppe von Ageta *et al.* (Ageta *et al.*, 2008). Sie verwendeten transgene Mäuse, welche Activin überexprimierten und danach einen weniger ängstlicheren Phänotyp aufzeigten. Dies zeigt den noch hohen Bedarf an Forschung, der zur Aufklärung des Mechanismus von Activin und der Pathologie der Angsterkrankung notwendig ist. Nichtsdestotrotz scheint Activin ein wichtiger Faktor bei der Entstehung von Angsterkrankungen zu sein. In dieser Arbeit konnte durch die spezifische Inhibition der Activinrezeptoren eine Reduktion der Neurofascin-Expression in primären hippocampalen Neuronen offengelegt werden. Eine Veränderung der NCAM-Expression als Kontrolle konnte nicht beobachtet werden. Dies weist auf einen

Neurofascin und womöglich AIS-spezifischen Effekt hin. Gegen einen AIS-spezifischen Effekt würde sprechen, dass die NF-Sonden zur Quantifizierung des Neurofascins neben den beiden neuronalen Isoformen auch die gliale Neurofascin 155-Isoform detektierten, welche nicht am AIS lokalisiert ist und im Gewebe in viel größeren Mengen exprimiert wird. Somit könnte ebenso eine potentielle Regulation des glialen Neurofascin 155 offengelegt worden sein. Aufgrund der Verwendung von hippocampalen neuronalen Kulturen, mit geringem Anteil glialer Zellen ist ein Effekt auf NF155 in diesem Zusammenhang unwahrscheinlich. Des Weiteren stellt sich die Frage, ob eine Stimulation der Neurone mit Activin eine Zunahme der NF-Expression verursachen würde. Die Gruppe von Ageta et al. zeigte, dass Activin während einer *Long-Term Potentiation* (LTP) hochreguliert wird. Dadurch konnten einerseits mehr exzitatorische präsynaptische Terminale an Dendriten gemessen werden. Außerdem induzierte die erhöhte Activin-Expression eine Spine-Verlängerung, durch Verlängerung der Spine-Hälsa. Nach dem Blocken des MAPK-Signalweges blieben diese Activin-induzierten Effekte aus (Andreasson & Worley, 1995, Inokuchi et al., 1996, Shoji-Kasai et al., 2007). Müller et al. konnten reduzierte NMDA-Ströme in transgenen Mäusen mit einem dominant-negativen Activin-Rezeptor nachweisen (Müller et al., 2006). Demnach könnten sich die exzitatorischen NMDA-Ströme nach Activin-Hochregulation ebenso erhöhen. Wenn Activin die NF-Expression am AIS auf gleiche Weise oder über den Smad-Signalweg hochregulieren würde, könnte es am AIS zu einer verstärkten Inhibition durch veränderte Gephyrin- und GABA_A-Rezeptor-Assemblierung kommen. Diese könnte der primär verursachten stärkeren Exzitation kompensatorisch entgegenwirken, durch eine Art Feedback-Inhibition.

Wäre Activin an der Regulierung von Neurofascin und Gephyrin am AIS beteiligt, könnte hier ein neuer Angriffspunkt für pharmakologische Interventionen hinsichtlich affektiver Störungen liegen. Ob eine bestimmte Neurofascin-Isoform durch Activin bzw. den Activin-Inhibitor reguliert wird, muss allerdings noch geklärt werden.

Nichtsdestotrotz wird deutlich, dass die Auswirkungen von Stress auf das Gehirn in seiner Struktur sowie seine kognitiven Funktionen sehr heterogen sind und es dadurch erschweren Ursachen und Folgen von Stress zu bestimmen.

Ausblick

In näherer Zukunft sollte die Neurofascin-Expression nach juvenilem Stress weiter charakterisiert werden. Es könnten Gehirne juvenil-gestresster Ratten auf ihre inhibitorischen synaptischen Strukturen hin untersucht werden. Eventuell könnten über die Neurofascin-Intensitäten am AIS Aussagen über eine erhöhte oder verringerte Neurofascin-Expression getroffen werden. Interessant wäre die Analyse juveniler Tiere, direkt nach der Stressexposition, um mögliche direkte Folgen eruieren zu können.

Des Weiteren könnte der Zusammenhang mit Activin und Neurofascin genauer untersucht werden. Eine Möglichkeit wäre die Detektion der einzelnen Isoformen nach dem Inhibitor-Einsatz gegen Activin-Rezeptoren. Außerdem könnte der Einsatz von siRNA gegen den ACVR2A im neuronalen System verifiziert werden. Somit könnte ein Einfluss auf die Gephyrin-Assemblierung untersucht werden. Interessant wäre auch, welcher Signalweg an diesem Effekt beteiligt ist. Durch Inhibitoreinsatz und Stimulation mit Activin könnten einzelne Komponenten des SMAD-Signalweges untersucht werden. Damit könnten neue mögliche Angriffspunkte einer pharmakologischen Therapie bei diversen affektiven Störungen offengelegt werden.

7 Literaturverzeichnis

- Ageta, H., Murayama, A., Migishima, R. et al. 2008. Activin in the brain modulates anxiety-related behavior and adult neurogenesis. *PLoS one*, **3**, e1869.
- Alberts, B. 1995. Zell-Zell-Adhäsion, Zellverbindungen und die extrazelluläre Matrix. In *Molekularbiologie der Zelle*, pp. 946-993.
- Amaral, D. G. & Witter, M. P. 1989. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, **31**, 571-591.
- Andreasson, K. & Worley, P. F. 1995. Induction of beta-A activin expression by synaptic activity and during neocortical development. *Neuroscience*, **69**, 781-796.
- Ango, F., Di Cristo, G., Higashiyama, H., Bennett, V., Wu, P. & Huang, Z. J. 2004. Ankyrin-based subcellular gradient of neurofascin, an immunoglobulin family protein, directs GABAergic innervation at purkinje axon initial segment. *Cell*, **119**, 257-272.
- Avital, A. & Richter-Levin, G. 2005. Exposure to juvenile stress exacerbates the behavioural consequences of exposure to stress in the adult rat. *Int J Neuropsychopharmacol*, **8**, 163-173.
- Basak, S., Raju, K., Babiarz, J., Kane-Goldsmith, N., Koticha, D. & Grumet, M. 2007. Differential expression and functions of neuronal and glial neurofascin isoforms and splice variants during PNS development. *Dev Biol*, **311**, 408-422.
- Baumann, S. W., Baur, R. & Sigel, E. 2001. Subunit arrangement of gamma-aminobutyric acid type A receptors. *The Journal of biological chemistry*, **276**, 36275-36280.
- Boucard, A. A., Chubykin, A. A., Comoletti, D., Taylor, P. & Sudhof, T. C. 2005. A splice code for trans-synaptic cell adhesion mediated by binding of neuroligin 1 to alpha- and beta-neurexins. *Neuron*, **48**, 229-236.
- Brooks-Kayal, A. R., Jin, H., Price, M. & Dichter, M. A. 1998. Developmental expression of GABA(A) receptor subunit mRNAs in individual hippocampal neurons in vitro and in vivo. *J Neurochem*, **70**, 1017-1028.
- Burkhardt, N. 2008. Der Beitrag von Neurofascin zur Entstehung und Lokalisation von Gephyrinclustern während der inhibitorischen Synaptogenese im ZNS. In *Universität Hohenheim*.
- Burkhardt, 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*, **36**, 59-70.
- Cambon, K., Hansen, S. M., Venero, C. et al. 2004. A synthetic neural cell adhesion molecule mimetic peptide promotes synaptogenesis, enhances presynaptic function, and facilitates memory consolidation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **24**, 4197-4204.
- Carras, P. L., Coleman, P. A. & Miller, R. F. 1992. Site of action potential initiation in amphibian retinal ganglion cells. *J Neurophysiol*, **67**, 292-304.
- Chih, B., Engelman, H. & Scheiffele, P. 2005. Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. *Science*, **307**, 1324-1328.
- Chubykin, A. A., Atasoy, D., Etherton, M. R. et al. 2007. Activity-dependent validation of excitatory versus inhibitory synapses by neuroligin-1 versus neuroligin-2. *Neuron*, **54**, 919-931.
- Dahlhaus, R., Hines, R. M., Eadie, B. D. et al. 2010. Overexpression of the cell adhesion protein neuroligin-1 induces learning deficits and impairs synaptic

- plasticity by altering the ratio of excitation to inhibition in the hippocampus. *Hippocampus*, **20**, 305-322.
- Dalva, M. B., McClelland, A. C. & Kayser, M. S. 2007. Cell adhesion molecules: signalling functions at the synapse. *Nat Rev Neurosci*, **8**, 206-220.
- Dalva, M. B., Takasu, M. A., Lin, M. Z. et al. 2000. EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation. *Cell*, **103**, 945-956.
- Danglot, L., Triller, A. & Bessis, A. 2003. Association of gephyrin with synaptic and extrasynaptic GABAA receptors varies during development in cultured hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci*, **23**, 264-278.
- Davis, J. Q. & Bennett, V. 1994. Ankyrin binding activity shared by the neurofascin/L1/NrCAM family of nervous system cell adhesion molecules. *The Journal of biological chemistry*, **269**, 27163-27166.
- Davis, J. Q., Lambert, S. & Bennett, V. 1996. Molecular composition of the node of Ranvier: identification of ankyrin-binding cell adhesion molecules neurofascin (mucin+/third FNIII domain-) and NrCAM at nodal axon segments. *The Journal of cell biology*, **135**, 1355-1367.
- Davis, J. Q., McLaughlin, T. & Bennett, V. 1993. Ankyrin-binding proteins related to nervous system cell adhesion molecules: candidates to provide transmembrane and intercellular connections in adult brain. *The Journal of cell biology*, **121**, 121-133.
- Davis, S., Gale, N. W., Aldrich, T. H. et al. 1994. Ligands for EPH-related receptor tyrosine kinases that require membrane attachment or clustering for activity. *Science*, **266**, 816-819.
- Dedovic, K., Duchesne, A., Andrews, J., Engert, V. & Pruessner, J. C. 2009. The brain and the stress axis: the neural correlates of cortisol regulation in response to stress. *Neuroimage*, **47**, 864-871.
- Dow, A. L., Russell, D. S. & Duman, R. S. 2005. Regulation of activin mRNA and Smad2 phosphorylation by antidepressant treatment in the rat brain: effects in behavioral models. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **25**, 4908-4916.
- Evans, D. L., Leserman, J., Pedersen, C. A. et al. 1989. Immune correlates of stress and depression. *Psychopharmacol Bull*, **25**, 319-324.
- Fanselow, M. S. & Dong, H. W. 2010. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*, **65**, 7-19.
- Feldman, S. & Conforti, N. 1980. Participation of the dorsal hippocampus in the glucocorticoid feedback effect on adrenocortical activity. *Neuroendocrinology*, **30**, 52-55.
- Feldman, S., Conforti, N. & Weidenfeld, J. 1995. Limbic pathways and hypothalamic neurotransmitters mediating adrenocortical responses to neural stimuli. *Neurosci Biobehav Rev*, **19**, 235-240.
- Freund, T. F. & Buzsaki, G. 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, **6**, 347-470.
- Fritschy, J. M. & Brunig, I. 2003. Formation and plasticity of GABAergic synapses: physiological mechanisms and pathophysiological implications. *Pharmacol Ther*, **98**, 299-323.
- Fritschy, J. M., Harvey, R. J. & Schwarz, G. 2008. Gephyrin: where do we stand, where do we go? *Trends in neurosciences*, **31**, 257-264.
- Gage, F. H. & Thompson, R. G. 1980. Differential distribution of norepinephrine and serotonin along the dorsal-ventral axis of the hippocampal formation. *Brain Res Bull*, **5**, 771-773.

- Goda, Y. & Davis, G. W. 2003. Mechanisms of synapse assembly and disassembly. *Neuron*, **40**, 243-264.
- Hassel, B., Rathjen, F. G. & Volkmer, H. 1997. Organization of the neurofascin gene and analysis of developmentally regulated alternative splicing. *The Journal of biological chemistry*, **272**, 28742-28749.
- Hedstrom, K. L., Xu, X., Ogawa, Y. et al. 2007. Neurofascin assembles a specialized extracellular matrix at the axon initial segment. *The Journal of cell biology*, **178**, 875-886.
- Heldin, C. H., Miyazono, K. & Ten Dijke, P. 1997. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, **390**, 465-471.
- Herman, J. P., Ostrander, M. M., Mueller, N. K. & Figueiredo, H. 2005. Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **29**, 1201-1213.
- Howard, A., Tamas, G. & Soltesz, I. 2005. Lighting the chandelier: new vistas for axo-axonic cells. *Trends in neurosciences*, **28**, 310-316.
- Hyman, S. E. 2005. Neurotransmitters. *Curr Biol*, **15**, R154-158.
- Inman, G. J., Nicolas, F. J., Callahan, J. F. et al. 2002. SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Molecular pharmacology*, **62**, 65-74.
- Inokuchi, K., Kato, A., Hiraia, K., Hishinuma, F., Inoue, M. & Ozawa, F. 1996. Increase in activin beta A mRNA in rat hippocampus during long-term potentiation. *FEBS Lett*, **382**, 48-52.
- Jacobson-Pick, S., Elkobi, A., Vander, S., Rosenblum, K. & Richter-Levin, G. 2008. Juvenile stress-induced alteration of maturation of the GABAA receptor alpha subunit in the rat. *Int J Neuropsychopharmacol*, **11**, 891-903.
- Jacobson, L. & Sapolsky, R. 1991. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev*, **12**, 118-134.
- Jedlicka, P., Hoon, M., Papadopoulos, T. et al. 2011. Increased dentate gyrus excitability in neuroligin-2-deficient mice in vivo. *Cereb Cortex*, **21**, 357-367.
- Jenkins, S. M., Kizhatil, K., Kramarcy, N. R., Sen, A., Sealock, R. & Bennett, V. 2001. FIGQY phosphorylation defines discrete populations of L1 cell adhesion molecules at sites of cell-cell contact and in migrating neurons. *Journal of cell science*, **114**, 3823-3835.
- Jung, M. W., Wiener, S. I. & McNaughton, B. L. 1994. Comparison of spatial firing characteristics of units in dorsal and ventral hippocampus of the rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **14**, 7347-7356.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H. & Jessel, T. M. 2000. *Principles of Neural Science*. McGraw-Hill.
- Kirschbaum, K., Kriebel, M., Kranz, E. U., Potz, O. & Volkmer, H. 2009. Analysis of non-canonical fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) interaction reveals regulatory and activating domains of neurofascin. *The Journal of biological chemistry*, **284**, 28533-28542.
- Kneussel, M. & Loebrich, S. 2007. Trafficking and synaptic anchoring of ionotropic inhibitory neurotransmitter receptors. *Biol Cell*, **99**, 297-309.
- Knowles, W. D. 1992. Normal anatomy and neurophysiology of the hippocampal formation. *J Clin Neurophysiol*, **9**, 252-263.

- Koticha, D., Babiarz, J., Kane-Goldsmith, N., Jacob, J., Raju, K. & Grumet, M. 2005. Cell adhesion and neurite outgrowth are promoted by neurofascin NF155 and inhibited by NF186. *Mol Cell Neurosci*, **30**, 137-148.
- Kriebel, M., Metzger, J., Trinks, S. et al. 2011. The cell adhesion molecule neurofascin stabilizes axo-axonic GABAergic terminals at the axon initial segment. *The Journal of biological chemistry*, **286**, 24385-24393.
- Krivosheya, D., Tapia, L., Levinson, J. N. et al. 2008. ErbB4-neuregulin signaling modulates synapse development and dendritic arborization through distinct mechanisms. *The Journal of biological chemistry*, **283**, 32944-32956.
- Lardi-Studler, B. & Fritschy, J. M. 2007. Matching of pre- and postsynaptic specializations during synaptogenesis. *Neuroscientist*, **13**, 115-126.
- Levinson, J. N., Chery, N., Huang, K. et al. 2005. Neuroligins mediate excitatory and inhibitory synapse formation: involvement of PSD-95 and neurexin-1beta in neuroligin-induced synaptic specificity. *The Journal of biological chemistry*, **280**, 17312-17319.
- Lowy, M. T., Gault, L. & Yamamoto, B. K. 1993. Adrenalectomy attenuates stress-induced elevations in extracellular glutamate concentrations in the hippocampus. *J Neurochem*, **61**, 1957-1960.
- Lupien, S. J., McEwen, B. S., Gunnar, M. R. & Heim, C. 2009. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci*, **10**, 434-445.
- Maclean, P. D. 1952. Some psychiatric implications of physiological studies on frontotemporal portion of limbic system (visceral brain). *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, **4**, 407-418.
- Magarinos, A. M., McEwen, B. S., Flugge, G. & Fuchs, E. 1996. Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **16**, 3534-3540.
- Malosio, M. L., Marqueze-Pouey, B., Kuhse, J. & Betz, H. 1991. Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain. *The EMBO journal*, **10**, 2401-2409.
- Massague, J., Attisano, L. & Wrana, J. L. 1994. The TGF-beta family and its composite receptors. *Trends Cell Biol*, **4**, 172-178.
- Mauch, D. H., Nagler, K., Schumacher, S. et al. 2001. CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science*, **294**, 1354-1357.
- McEwen, B. S. 1999. Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci*, **22**, 105-122.
- Miles, R., Tóth, K., Gulyas, A. I., Hajos, N. & Freund, T. F. 1995. Differences between Somatic and Dendritic Inhibition in the Hippocampus. *Neuron*, **16**, 815-823.
- Milev, P., Maurel, P., Chiba, A. et al. 1998. Differential regulation of expression of hyaluronan-binding proteoglycans in developing brain: aggrecan, versican, neurocan, and brevican. *Biochem Biophys Res Commun*, **247**, 207-212.
- Moser, M. B. & Moser, E. I. 1998. Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus*, **8**, 608-619.
- Muller, M. R., Zheng, F., Werner, S. & Alzheimer, C. 2006. Transgenic mice expressing dominant-negative activin receptor IB in forebrain neurons reveal novel functions of activin at glutamatergic synapses. *The Journal of biological chemistry*, **281**, 29076-29084.
- Owczarek, S., Kiryushko, D., Larsen, M. H. et al. 2010. Neuroplastin-55 binds to and signals through the fibroblast growth factor receptor. *FASEB journal : official*

- publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, **24**, 1139-1150.
- Patton, P. E. & Mcnaughton, B. 1995. Connection matrix of the hippocampal formation: I. The dentate gyrus. *Hippocampus*, **5**, 245-286.
- Poulopoulos, A., Aramuni, G., Meyer, G. et al. 2009. Neuroligin 2 drives postsynaptic assembly at perisomatic inhibitory synapses through gephyrin and collybistin. *Neuron*, **63**, 628-642.
- Pruss, T., Kranz, E. U., Niere, M. & Volkmer, H. 2006. A regulated switch of chick neurofascin isoforms modulates ligand recognition and neurite extension. *Mol Cell Neurosci*, **31**, 354-365.
- Ratcliffe, C. F., Westenbroek, R. E., Curtis, R. & Catterall, W. A. 2001. Sodium channel beta1 and beta3 subunits associate with neurofascin through their extracellular immunoglobulin-like domain. *The Journal of cell biology*, **154**, 427-434.
- Rathjen, F. G., Wolff, J. M., Chang, S., Bonhoeffer, F. & Raper, J. A. 1987. Neurofascin: a novel chick cell-surface glycoprotein involved in neurite-neurite interactions. *Cell*, **51**, 841-849.
- Reid, T., Bathorn, A., Ahmadian, M. R. & Collard, J. G. 1999. Identification and characterization of hPEM-2, a guanine nucleotide exchange factor specific for Cdc42. *The Journal of biological chemistry*, **274**, 33587-33593.
- Roceri, M., Hendriks, W., Racagni, G., Ellenbroek, B. A. & Riva, M. A. 2002. Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Molecular psychiatry*, **7**, 609-616.
- Saghatelian, A. K., Nikonenko, A. G., Sun, M. et al. 2004. Reduced GABAergic transmission and number of hippocampal perisomatic inhibitory synapses in juvenile mice deficient in the neural cell adhesion molecule L1. *Mol Cell Neurosci*, **26**, 191-203.
- Saiepour, L., Fuchs, C., Patrizi, A., Sassoe-Pognetto, M., Harvey, R. J. & Harvey, K. 2010. Complex role of collybistin and gephyrin in GABAA receptor clustering. *The Journal of biological chemistry*, **285**, 29623-29631.
- Sandi, C., Merino, J. J., Cordero, M. I., Touyarot, K. & Venero, C. 2001. Effects of chronic stress on contextual fear conditioning and the hippocampal expression of the neural cell adhesion molecule, its polysialylation, and L1. *Neuroscience*, **102**, 329-339.
- Sarto-Jackson, I., Milenkovic, I., Smalla, K. H. et al. 2012. The cell adhesion molecule neuropilin-2 is a novel interaction partner of gamma-aminobutyric acid type A receptors. *The Journal of biological chemistry*, **287**, 14201-14214.
- Schachner, M. 1997. Neural recognition molecules and synaptic plasticity. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 627-634.
- Schafer, D. P., Bansal, R., Hedstrom, K. L., Pfeiffer, S. E. & Rasband, M. N. 2004. Does paranode formation and maintenance require partitioning of neurofascin 155 into lipid rafts? *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **24**, 3176-3185.
- Scheiffele, P. 2003. Cell-cell signaling during synapse formation in the CNS. *Annu Rev Neurosci*, **26**, 485-508.
- Sherman, D. L., Tait, S., Melrose, S. et al. 2005. Neurofascins are required to establish axonal domains for saltatory conduction. *Neuron*, **48**, 737-742.
- Shoji-Kasai, Y., Ageta, H., Hasegawa, Y., Tsuchida, K., Sugino, H. & Inokuchi, K. 2007. Activin increases the number of synaptic contacts and the length of dendritic spine necks by modulating spinal actin dynamics. *Journal of cell science*, **120**, 3830-3837.

- Somogyi, P., Smith, A. D., Nunzi, M. G., Gorio, A., Takagi, H. & Wu, J. Y. 1983. Glutamate decarboxylase immunoreactivity in the hippocampus of the cat: distribution of immunoreactive synaptic terminals with special reference to the axon initial segment of pyramidal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **3**, 1450-1468.
- Soriano, E. & Frotscher, M. 1989. A GABAergic axo-axonic cell in the fascia dentata controls the main excitatory hippocampal pathway. *Brain research*, **503**, 170-174.
- Sudhof, T. C. 2008. Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature*, **455**, 903-911.
- Tretter, V., Jacob, T. C., Mukherjee, J., Fritschy, J. M., Pangalos, M. N. & Moss, S. J. 2008. The clustering of GABA(A) receptor subtypes at inhibitory synapses is facilitated via the direct binding of receptor alpha 2 subunits to gephyrin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **28**, 1356-1365.
- Tretter, V., Kerschner, B., Milenkovic, I. et al. 2011. Molecular basis of the gamma-aminobutyric acid A receptor alpha3 subunit interaction with the clustering protein gephyrin. *The Journal of biological chemistry*, **286**, 37702-37711.
- Trudeau, V. L., Theodosis, D. T. & Poulain, D. A. 1997. Activin facilitates neuronal development in the rat amygdala. *Neuroscience letters*, **237**, 33-36.
- Tsoory, M., Cohen, H. & Richter-Levin, G. 2007. Juvenile stress induces a predisposition to either anxiety or depressive-like symptoms following stress in adulthood. *Eur Neuropsychopharmacol*, **17**, 245-256.
- Tyagarajan, S. K. & Fritschy, J. M. 2010. GABA(A) receptors, gephyrin and homeostatic synaptic plasticity. *The Journal of physiology*, **588**, 101-106.
- Vaiva, G., Thomas, P., Ducrocq, F. et al. 2004. Low posttrauma GABA plasma levels as a predictive factor in the development of acute posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry*, **55**, 250-254.
- Van Eekelen, J. A., Jiang, W., De Kloet, E. R. & Bohn, M. C. 1988. Distribution of the mineralocorticoid and the glucocorticoid receptor mRNAs in the rat hippocampus. *J Neurosci Res*, **21**, 88-94.
- Varoqueaux, F., Jamain, S. & Brose, N. 2004. Neuroligin 2 is exclusively localized to inhibitory synapses. *Eur J Cell Biol*, **83**, 449-456.
- Venero, C., Tilling, T., Hermans-Borgmeyer, I., Schmidt, R., Schachner, M. & Sandi, C. 2002. Chronic stress induces opposite changes in the mRNA expression of the cell adhesion molecules NCAM and L1. *Neuroscience*, **115**, 1211-1219.
- Villarreal, G., Hamilton, D. A., Petropoulos, H. et al. 2002. Reduced hippocampal volume and total white matter volume in posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry*, **52**, 119-125.
- Volkmer, H., Hassel, B., Wolff, J. M., Frank, R. & Rathjen, F. G. 1992. Structure of the axonal surface recognition molecule neurofascin and its relationship to a neural subgroup of the immunoglobulin superfamily. *The Journal of cell biology*, **118**, 149-161.
- Volkmer, H., Leuschner, R., Zacharias, U. & Rathjen, F. G. 1996. Neurofascin induces neurites by heterophilic interactions with axonal NrCAM while NrCAM requires F11 on the axonal surface to extend neurites. *The Journal of cell biology*, **135**, 1059-1069.
- Volkmer, H., Zacharias, U., Norenberg, U. & Rathjen, F. G. 1998. Dissection of complex molecular interactions of neurofascin with axonin-1, F11, and tenascin-R, which promote attachment and neurite formation of tectal cells. *The Journal of cell biology*, **142**, 1083-1093.

- Washbourne, P., Dityatev, A., Scheiffele, P. et al. 2004. Cell adhesion molecules in synapse formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **24**, 9244-9249.
- Werner, S. & Alzheimer, C. 2006. Roles of activin in tissue repair, fibrosis, and inflammatory disease. *Cytokine Growth Factor Rev*, **17**, 157-171.
- Witter, M. P. 2007. The perforant path: projections from the entorhinal cortex to the dentate gyrus. *Prog Brain Res*, **163**, 43-61.
- Yu, W., Jiang, M., Miralles, C. P., Li, R. W., Chen, G. & De Blas, A. L. 2007. Gephyrin clustering is required for the stability of GABAergic synapses. *Mol Cell Neurosci*, **36**, 484-500.
- Zhang, L., Zhou, R., Li, X., Ursano, R. J. & Li, H. 2006. Stress-induced change of mitochondria membrane potential regulated by genomic and non-genomic GR signaling: a possible mechanism for hippocampus atrophy in PTSD. *Med Hypotheses*, **66**, 1205-1208.
- Zheng, F., Adelsberger, H., Muller, M. R., Fritschy, J. M., Werner, S. & Alzheimer, C. 2009. Activin tunes GABAergic neurotransmission and modulates anxiety-like behavior. *Molecular psychiatry*, **14**, 332-346.
- Zonta, B., Desmazieres, A., Rinaldi, A. et al. 2011. A critical role for Neurofascin in regulating action potential initiation through maintenance of the axon initial segment. *Neuron*, **69**, 945-956.