

**Identifizierung neuer Funktionen
SRF-vermittelter Genexpression
beim Aufbau neuronaler Netzwerke**

Dissertation

**der Fakultät für Biologie
der EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften**

von

Christine Stritt, geb. Fiedler
aus Rottweil

vorgelegte
Dissertation
2009

Tag der mündlichen Prüfung:

12. Oktober 2009

Dekan:

Prof. Dr. H. A. Mallot

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. A. Nordheim

2. Berichterstatter:

Priv. Doz. Dr. A. Wizenmann

Danksagung

- Ich danke **Prof. Dr. A. Nordheim** für die freundliche Aufnahme in seiner Abteilung, für Kritik, Anregungen und neue Ideen während der *Research Reports* und für das Korrekturlesen unserer Veröffentlichungen.
- Mein größter Dank gilt **Dr. Bernd Knöll** für die hervorragende Betreuung und Zusammenarbeit während meiner gesamten Doktorarbeit. Rückblickend stelle ich gerne fest, dass sich die viele Arbeit gelohnt hat, und es darüber hinaus auch noch sehr viel Spaß eingebracht hat!
- Allen Mitgliedern der **Arbeitsgruppe Knöll**, insbesondere **Sina, Daniela, Christin, Kai und Henning** danke ich für alle Hilfen und das beste Arbeitsgruppenklima, das man sich nur wünschen konnte. Ihr habt wesentlich dazu beigetragen, dass man trotz manchem Stress immer gerne zur Arbeit ging.
- Allen **Mitarbeitern der Abt. Molekularbiologie**, die mich in den letzten Jahren begleitet haben, danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre, hilfreichen Gespräche und Diskussionen. Unserer „**Frauenrunde**“, die für abwechslungsreiche Auszeiten außerhalb des Laboralltages sorgte, werde ich noch lange nachtrauern.
- Meiner **Familie** und **meinem Mann** danke ich für jegliche Unterstützung moralischer und finanzieller Art und für ihr fortlaufendes Interesse und Verständnis während meiner gesamten Ausbildungszeit.

1	EINLEITUNG	1
1.1	TRANSKRIPTIONELLE REGULATION DURCH DEN <i>SERUM RESPONSE FACTOR</i> (SRF)	1
1.1.1	<i>Der Transkriptionsfaktor SRF</i>	1
1.1.2	<i>Partnerproteine von SRF</i>	1
1.1.3	<i>Signalwege zur Aktivierung SRF-vermittelter Transkription</i>	3
1.1.4	<i>Biologische Funktionen von SRF</i>	5
1.2	AUFBAU NEURONALER NETZWERKE IN DER GEHIRNENTWICKLUNG	7
1.2.1	<i>Neuronale Differenzierung im Hippocampus</i>	7
1.2.1.1	Aufbau von Zell- und Faserschichten im Hippocampus	7
1.2.1.2	Dendritenmorphologie hippocampaler CA1-Neurone	10
1.2.1.3	Dendritische Dornfortsätze („ <i>spines</i> “)	11
1.2.2	<i>Funktionen von Reelin in der Gehirnentwicklung</i>	12
1.2.3	<i>Die axonale Myelinisierung im Zentralen Nervensystem</i>	15
1.2.3.1	Aufbau und Funktion von Myelin	15
1.2.3.2	Entwicklung von Oligodendrocyten	16
1.2.3.3	Neuronale Kontrolle der Oligodendrocytendifferenzierung	17
1.2.4	<i>Funktionen von SRF in der Gehirnentwicklung</i>	19
1.3	ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	24
2	MATERIAL UND METHODEN	25
2.1	MATERIALIEN	25
2.1.1	<i>Chemikalien, Medien, Lösungen und Puffer</i>	25
2.1.1.1	Allgemeine Chemikalien	25
2.1.1.2	Materialien für die neuronale Zellkultur	26
2.1.1.3	Materialien für die immunocytochemische Färbung	27
2.1.1.4	Materialien für die immunhistochemische Färbung	28
2.1.1.5	Materialien für die HEK293- Zellkultur	29
2.1.1.6	Materialien für die Genotypisierung	30
2.1.1.7	Materialien für die Agarose-Gelelektrophorese	30
2.1.1.8	Materialien für die RNA-Isolierung	31
2.1.1.9	Materialien für den DNaseI-Verdau	31
2.1.1.10	Materialien für die cDNA-Synthese	31
2.1.1.11	Materialien für die RT-PCR	32
2.1.1.12	Materialien für <i>Affymetrix GeneChips</i>	32
2.1.1.13	Materialien zur Gewinnung von Proteinextrakten	32
2.1.1.14	Materialien für die Proteinbestimmung nach Bradford	33
2.1.1.15	Materialien für die SDS-PAGE	33
2.1.1.16	Materialien für den Western Blot	34
2.1.1.17	Materialien für den Pulldown Assay	34
2.1.2	<i>Antikörper</i>	36
2.1.2.1	Primäre Antikörper für die Immunhistologie	36
2.1.2.2	Primäre Antikörper für die Immunocytochemie	37

2.1.2.3	Primäre Antikörper für den Western Blot	37
2.1.2.4	Primäre Antikörper für den Rho Pulldown Assay	37
2.1.2.5	Sekundäre Antikörper	37
2.1.3	Oligonukleotide	38
2.1.3.1	Primer für die Genotypisierung	38
2.1.3.2	Primer für die RT-PCR	38
2.1.4	Mausstämme	40
2.1.5	Viren	40
2.1.6	Plasmide	40
2.2	METHODEN	41
2.2.1	Zellbiologische Methoden	41
2.2.1.1	Herstellung primärer neuronaler Zellkulturen der Maus	41
2.2.1.1.1	Säurevorbehandlung von Deckgläschen	41
2.2.1.1.2	Beschichtung von Deckgläschen und Zellkulturschalen	41
2.2.1.1.3	Präparation und Herstellung neuronaler Primärkulturen	41
2.2.1.1.4	Elektroporation neuronaler Primärkulturen	43
2.2.1.1.5	Adenovirale Transfektion neuronaler Primärkulturen	43
2.2.1.1.6	Stimulation neuronaler Primärkulturen mit Reelin und BDNF	43
2.2.1.2	Immuncytochemische Färbung	44
2.2.1.3	Immunhistologische Färbung	45
2.2.1.4	HEK293 Zellkultur	46
2.2.1.4.1	Kultivierung von GFP/Reelin exprimierenden HEK293 Zellen	46
2.2.1.4.2	Einfrieren von GFP/Reelin exprimierenden HEK293 Zellen (Kryokonservierung)	46
2.2.1.4.3	Auftauen von GFP/Reelin exprimierenden HEK293 Zellen	47
2.2.1.4.4	Gewinnung und Aufkonzentrierung Reelin-haltiger Überstände/Kontrollüberstände	47
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	48
2.2.2.1	Genotypisierung der Mäuse	48
2.2.2.1.1	Lyse der Schwanzbiopsie	48
2.2.2.1.2	PCR zur Bestimmung des <i>Srf</i> Genotyps	48
2.2.2.1.3	PCR zur Bestimmung des <i>CamKIIaCre</i> Genotyps	49
2.2.2.1.4	PCR zur Bestimmung des <i>Reelin</i> Genotyps	49
2.2.2.1.5	PCR zur Bestimmung des <i>Thy1-GFP</i> Genotyps	50
2.2.2.1.6	Agarose-Gelelektrophorese	50
2.2.2.2	RNA-Isolation aus neuronaler Zellkultur (<i>RNeasy[®] mini kit</i> , QIAGEN)	51
2.2.2.3	RNA-Isolierung aus neuronalem Gewebe (<i>RNeasy[®] mini kit</i> , QIAGEN)	51
2.2.2.4	DNaseI-Verdau	52
2.2.2.5	Bestimmung der RNA-Konzentration	52
2.2.2.6	cDNA-Synthese	52
2.2.2.7	Semiquantitative Real Time - PCR (RT-PCR)	53
2.2.2.8	Genexpressionsanalysen mittels <i>Affymetrix GeneChip[®] Arrays</i>	54
2.2.2.8.1	Eigenschaften der verwendeten <i>GeneChips[®]</i>	54
2.2.2.8.2	Probenaufarbeitung	55
2.2.2.8.3	<i>Affymetrix GeneChip</i> Protokoll	55
2.2.2.8.4	Statistische Auswertung der Expressionsdaten	56
2.2.3	Biochemische Methoden	57

2.2.3.1	Herstellung von Proteinextrakten aus hippocampalem Gewebe.....	57
2.2.3.2	Proteinbestimmung nach Bradford.....	57
2.2.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	57
2.2.3.4	Western Blot.....	58
2.2.3.5	Quantifizierung von Banden im Western Blot.....	59
2.2.3.6	Rho Pulldown Assay.....	59
2.2.3.6.1	Herstellung von Sepharose-gekoppelten C21-GST-Fusionsproteinen.....	59
2.2.3.6.2	Herstellung der Gewebelysate.....	60
2.2.3.6.3	Pulldown Assay.....	60
2.2.3.6.4	Detektion der aktiven Rho-GTP-Menge im Western Blot.....	60
2.2.3.6.5	Herstellung von Glycerolstocks.....	61
2.2.4	<i>Statistik und Auswertung von Bildern</i>	61
3	ERGEBNISSE	62
3.1	ERGEBNISSE ZUM MANUSKRIFT 1.....	62
3.1.1	<i>SRF als Regulator der Oligodendrocytendifferenzierung</i>	62
3.1.2	<i>CTGF als Mediator der SRF-abhängigen Oligodendrocytendifferenzierung</i>	64
3.1.2.1	<i>Ctgf als neues SRF-Zielgen im Gehirn</i>	65
3.1.2.2	<i>CTGF als Antagonist IGF-vermittelter Oligodendrocytendifferenzierung</i>	66
3.2	ERGEBNISSE ZUM MANUSKRIFT 2.....	68
3.2.1	<i>Phänotypische Besonderheiten SRF-defizienter Neurone</i>	68
3.2.2	<i>Aktindynamik moduliert SRF-abhängig neuronale Motilität</i>	69
3.2.3	<i>Aktin kann über Beeinflussung der Genexpression neuronale Motilität regulieren</i>	70
3.3	ERGEBNISSE ZUM MANUSKRIFT 3.....	71
3.3.1	<i>SRF reguliert im Hippocampus die Ausbildung von Zell- und Faserschichten</i>	72
3.3.2	<i>SRF reguliert in hippocampalen CA1-Pyramidenzellen die Ausbildung von Dendriten und dendritischen Dornfortsätzen</i>	73
3.3.3	<i>Untersuchungen einer möglichen Interaktion zwischen der Reelin-Signalkaskade und SRF-vermittelter Genexpression</i>	74
4	DISKUSSION	77
4.1	DISKUSSION ZUM MANUSKRIFT 1.....	77
4.1.1	<i>SRF reguliert die Oligodendrocytendifferenzierung über einen parakrinen Mechanismus</i> 77	
4.1.2	<i>Mechanismen SRF-vermittelter Transkriptionsregulation</i>	79
4.2	DISKUSSION ZUM MANUSKRIFT 2.....	80
4.3	DISKUSSION ZUM MANUSKRIFT 3.....	83
4.3.1	<i>SRF als Regulator der hippocampalen Entwicklung</i>	83
4.3.2	<i>Untersuchung einer möglichen Interaktion zwischen Reelin und SRF-vermittelter Genexpression</i>	85
5	ZUSAMMENFASSUNG	89
6	SUMMARY	91

7	REFERENZEN	93
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	106
9	EIGENANTEIL AN DEN VORGELEGTEN MANUSKRIPTE/ PUBLIKATIONEN	111
10	MANUSKRIPTE	
11	LEBENS LAUF	

1 Einleitung

1.1 Transkriptionelle Regulation durch den *Serum Response Factor (SRF)*

1.1.1 Der Transkriptionsfaktor SRF

Der *Serum Response Factor* (SRF) ist ein stark konservierter und ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor (Norman et al., 1988). Er gehört zur Familie der MADS-Box-Proteine (MCM1, Agamous, Deficiens, SRF), welche durch eine hochkonservierte DNA-Bindedomäne, die sog. MADS-Box, charakterisiert sind (Shore and Sharrocks, 1995). SRF bindet als Homodimer an ein als CArG-Box bezeichnetes *cis*-regulatorisches DNA-Element, welches im Idealfall die Konsensussequenz CC(A/T)₆GG besitzt (Minty and Kedes, 1986; Sun et al., 2006; Treisman, 1986). Geringfügige Abweichungen von der Konsensussequenz werden toleriert, beeinflussen jedoch die Bindeaffinität von SRF an die DNA (Chang et al., 2001; Hautmann et al., 1998). CArG-Boxen wurden bisher in den Promotoren von über 100 Genen identifiziert (Cooper et al., 2007; Stritt et al., 2009; Sun et al., 2006; Zhang et al., 2005). Zu den SRF-regulierten Zielgenen gehören insbesondere die *immediate early genes* (IEGs) (z.B. *c-Fos*, *Egr-1* und *Egr-2*) und zytoskeletale Gene, die primär für Komponenten des Aktinzytoskeletts kodieren (z.B. *Actb*, *Actg*, *Gsn*, *Vcl*, *Arc*, *Tpm*).

1.1.2 Partnerproteine von SRF

Transkriptionsfaktoren regulieren die Expression von Genen, indem sie sich mit verschiedenen Interaktionspartnern, z.B. mit Chromatin-modellierenden Faktoren (wie Histondeacetylasen (HDACs)), zu großen Multiproteinkomplexen zusammenlagern. Als Paradebeispiel für die Multiproteinkomplexbildung von

Transkriptionsfaktoren, zählt z.B. CREB (Lonze and Ginty, 2002). Auch SRF interagiert mit verschiedenen Partnerproteinen und kann dadurch Genexpression signal- und zelltypspezifisch regulieren (Posern and Treisman, 2006).

Zu den bekanntesten Kofaktoren von SRF zählen die Mitglieder der TCF- (*ternary complex factor*) und der MRTF- (*myocardin-related transcription factors*) Familie. **TCFs**, zu denen **Elk-1** (*Ets-like transcription factor*), **SAP-1** (*SRF accessory protein 1*) und **Net** (*new ets transcription factor*) zählen, gehören zur Familie der Ets-Proteine (*E-twenty-six*) und werden durch verschiedene MAP (*mitogen activated protein*)-Kinasen aktiviert (Buchwalter et al., 2004). TCFs binden mit ihrer Ets-DNA-Bindedomäne an eine zur CArG-Box benachbarte TCF-Bindestelle mit der Kernsequenz GGA(AT). TCF-Bindestelle und CArG-Box bilden zusammen das *serum response element* (SRE). SREs sind in zahlreichen Promotoren von IEGs (z.B. *c-Fos*, *Egr-1*, *Cyr61*) zu finden.

Zu den Mitgliedern der **MRTF-Familie** zählen **Myocardin**, **MRTF-A/MAL/MKL1** (*megakaryoblastic leukemia 1*) und **MRTF-B/MKL2** (*megakaryoblastic leukemia 2*) (Pipes et al., 2006). Diese Gruppe reguliert zusammen mit SRF v.a. die Transkription von zytoskeletalen Genen, z.B. solche, die für die Muskeldifferenzierung verantwortlich sind (z.B. *Myogenin*, *Myo D*). Im Gegensatz zu MAL und MRTF-B, die ubiquitär exprimiert werden, kommt Myocardin nur in Herz- und Glattmuskelzellen vor (Wang et al., 2001; Wang et al., 2002). TCFs und MRTFs stehen in einem Wettbewerb zueinander, da sie um dieselbe Bindestelle an SRF konkurrieren (Posern and Treisman, 2006). In Glattmuskelzellen wurde gezeigt, dass aktiviertes Elk-1 Myocardin von SRF verdrängen kann, wodurch die Expression glattmuskelspezifischer Gene inhibiert wird, und die Zellen von einem differenzierten /kontraktilen Status zu einem proliferativen Status übergehen (Wang et al., 2004).

Neben TCFs und MRTFs wurden verschiedene andere SRF-Interaktionspartner identifiziert. Mitglieder der GATA-Familie der Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren und Mitglieder der Nkx2-5 Familie der Homeodomäne-Proteine zählen zu den aktivierenden SRF-Kofaktoren (Belaguli et al., 2000; Chen and Schwartz, 1996; Sepulveda et al., 2002). Neben den aktivierenden SRF-Kofaktoren wurde auch eine Reihe von Faktoren entdeckt, die SRF-vermittelte Transkription reprimieren können. Zu diesen inhibitorischen Kofaktoren zählen FHL2 (*four-and-a-half Lim domain protein 2*), welches durch SRF reguliert wird, HOP (*homeodomain-only protein*) und Elk-1. FHL2 wirkt als Antagonist zu MAL (Philippart et al., 2004). HOP blockiert die

Bindung von SRF an DNA (Chen et al., 2002; Shin et al., 2002) und kann Histondeacetylasen an den Promotor rekrutieren (Kook et al., 2003). Elk-1 kann wie bereits erwähnt als Antagonist zu Myocardin wirken (Wang et al., 2004) oder durch die Rekrutierung von mSin3A-HDAC Genexpression inhibieren (Yang et al., 2002).

1.1.3 Signalwege zur Aktivierung SRF-vermittelter Transkription

Die Aktivierung SRF-vermittelter Genexpression wird durch unterschiedliche Signalwege reguliert (Posern and Treisman, 2006) (**siehe Abb. 1.1**). Zu den Hauptsignalwegen zählen der TCF-abhängige und der Rho/Aktin/MAL-Signalweg.

Im **TCF-abhängigen Signalweg** werden nach Auslösen der MAP-Kinase-Signalkaskade (*mitogen-activated protein kinase*) die TCFs durch die MAP-Kinasen ERK (*extracellular-signal regulated kinase*), JNK (*Jun N-terminal kinase*) oder p38/SAPK (*stress-activated protein kinase*) phosphoryliert und dadurch aktiviert (Cahill et al., 1996).

Die Aktivierung von MAL erfolgt dagegen primär in einem **Rho/Aktin abhängigen Signalweg** (Miralles et al., 2003). Durch die Aktivierung von RhoA kommt es über Effektoren wie ROCK (*Rho associated kinase*) und mDia (*mammalian Diaphanous-related formins*) zum Anstieg der F-Aktin-Menge (filamentöses Aktin) in der Zelle. ROCK kann F-Aktin stabilisieren, indem es die LIM Kinase aktiviert, die wiederum das Aktin schneidende Protein Cofilin durch Phosphorylierung inhibiert. Die Aktivierung von mDia stimuliert stattdessen die Polymerisation von Aktin. Durch die gesteigerte Aktin-Polymerisation wird MAL, welches in unstimulierten Zellen im Zytoplasma an G-Aktin (globuläres Aktin) gebunden vorliegt, freigesetzt und transloziert in den Nukleus, wo es als SRF-Koaktivator agiert (Settleman, 2003). In Fibroblasten wurde berichtet, dass die Aktivität von MAL im Nukleus und der Export von MAL zurück ins Zytoplasma zusätzlich durch nukleäres G-Aktin reguliert wird (Vartiainen, 2008; Vartiainen et al., 2007).

Lange Zeit wurden der TCF-abhängige Signalweg und der RhoA/MAL Signalweg als getrennt verlaufende Signalwege betrachtet. Neuere Daten u.a. in Neuronen weisen jedoch darauf hin, dass eine Interaktion zwischen beiden Signalwegen stattfindet. Hierbei kann MAL durch Erk-1 phosphoryliert werden, was sich auf die Induktion von

Genen und den nukleären Export von MAL auswirken kann (Kalita et al., 2006; Muehlich et al., 2008).

Weitere Signalwege, die die Aktivität von SRF über Phosphorylierung beeinflussen können, beinhalten die Kalzium-aktivierte Kinase II (CaMKII) (Johnson et al., 1997; Miranti et al., 1995; Misra et al., 1994) sowie weitere Kinasen (**siehe Abb. 1.1**).

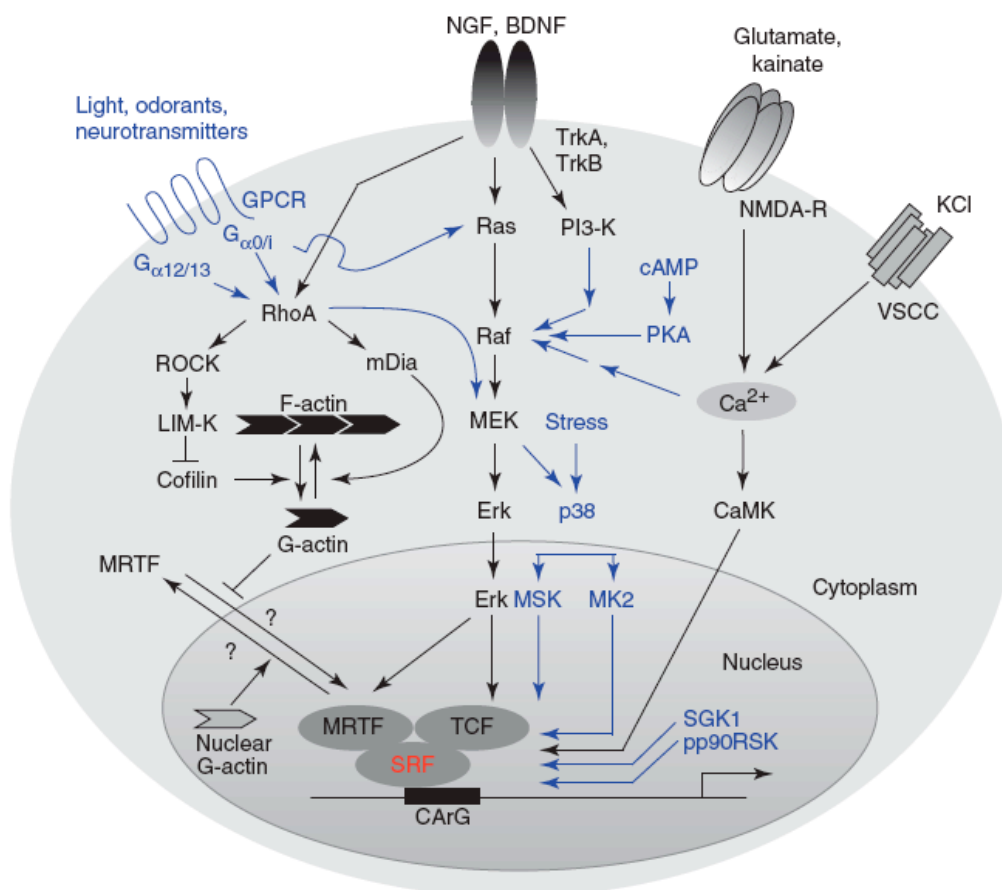


Abb. 1.1 Signalwege zur Regulierung der Aktivität von SRF und seiner Partnerproteine, Abb. aus (Knoll and Nordheim, 2009)

In Neuronen kann SRF-vermittelte Transkription durch verschiedene Stimuli, z.B. Wachstumsfaktoren (NGF, BDNF) oder über neuronale Aktivität induziert werden. Die Aktivierung von SRF und seiner Partnerproteine erfolgt über die Aktivierung des Rho/Aktin Signalwegs (Aktivierung von MAL), über MAP-Kinasen (Aktivierung von TCFs) oder über verschiedene Kinasen, wie z.B. CaMK. In Neuronen ist die Translokation von MAL in den Nucleus noch umstritten (durch Fragezeichen gekennzeichnet) (siehe auch Diskussion 4.2). Für weitere Erläuterungen siehe Text.

Zusammenfassend besitzt SRF als Transkriptionsfaktor die hervorragende Eigenschaft, sehr stark durch zytoskeletale Aktindynamik reguliert zu werden. Gleichzeitig kann SRF aber auch selbst, durch die transkriptionelle Kontrolle von zytoskeletalen Genen, wiederum auf die Aktindynamik zurückgreifen.

1.1.4 Biologische Funktionen von SRF

Durch die Herstellung und Untersuchung konstitutiver und konditionaler, gewebespezifischer *Srf* Mausmutanten, konnten zahlreiche Funktionen von SRF in verschiedenen Differenzierungs- und Entwicklungsprozessen entschlüsselt werden.

In **konstitutiven** *Srf* Mutanten bleibt die ab E6.5 (embryonaler Tag 6.5) einsetzende Bildung des Mesoderms aus, wodurch die Embryonen bereits in der frühen Gastrulationsphase absterben (Arsenian et al., 1998). In isolierten murinen **embryonalen Stammzellen (ES)-Zellen** führt die Deletion von *Srf* zur verminderten Expression von IEGs und *Aktin* (Schratt et al., 2001). Fokale Adhäsionsproteine, wie Vinculin, Zyxin, Talin und β 1-Integrin sind ebenfalls herunterreguliert. Die verminderte Expression zytoskeletaler und fokaler (Adhäsions-) Proteine äußerte sich in fehlenden Lamellipodien und Stressfasern und führt zu Defekten in Adhäsion und Migration der Zellen (Schratt et al., 2002).

Da die konstitutive Deletion von *Srf* bereits im frühen Embryonalstadium zum Absterben der Mausembryonen führt, wurden um Funktionen von SRF auch noch zu späteren Entwicklungszeitpunkten analysieren zu können, verschiedene **konditionale** *Srf* Mutanten hergestellt.

Die konditionale *Srf*-Deletion im **Herzmuskel** führt aufgrund schwerwiegender kardialer Defekte zur embryonalen Letalität zwischen Tag E10.5 und E13.5. Gleichzeitig ist die Expression wichtiger Transkriptionsfaktoren zur Herzentwicklung, wie Nkx2.5, GATA4, Myocardin und c-Fos in diesen Mäusen drastisch reduziert (Parlakian et al., 2004). Eine zeitlich induzierte *Srf*-Deletion im Herzmuskel von adulten Mäusen führt zu Kardiomyopathie, gestörter Sarkomerstruktur, Herunterregulierung herzmuskelspezifischer Gene und verursacht letztlich nach 10 Tagen den Tod der Mäuse (Parlakian et al., 2005; Parlakian et al., 2004). Die gleichzeitige Deletion von *Srf* in **Kardiomyocyten und vaskulären Glattmuskelzellen** führt ebenfalls zur embryonalen Letalität (E11.5), die mit kardialen Defekten, gestörter Sarkomerstruktur und der Herunterregulierung muskelspezifischer Gene einhergeht. Außerdem wurde eine verminderte Migration von Glattmuskelzellen zur Aorta und das Fehlen von Aktin/Intermediärfilament-Bündeln festgestellt (Miano et al., 2004). Die SRF-Defizienz in **Glattmuskelzellen** adulter Mäuse bewirkt eine drastisch reduzierte Kontraktionsfähigkeit der intestinalen Glattmuskulatur, was einen Nahrungsstau im Darm verursacht und schließlich zum

Tod der Mäuse führt (Angstenberger et al., 2007; Mericskay et al., 2007). In **Skelettmuskeln** führt die konditionale Deletion von *Srf* durch schwerwiegende Myopathien zu perinataler Letalität (Li et al., 2005). In adulten Tieren führt eine in Skelettmuskelzellen induzierte *Srf*-Deletion zu stark vermindertem Muskelwachstum, verminderter Regeneration von Myofibrillen und reduzierter Expression von muskelspezifischen Genen und von *IL-4* und *IGF-1* (Charvet et al., 2006).

Des Weiteren wurde für SRF eine Funktion in der Entwicklung des Blutgefäßsystems gezeigt (Chai et al., 2004; Franco et al., 2008; Holtz and Misra, 2008). Die Deletion von *Srf* in **Endothelzellen** führt zu Hämorrhagien und embryonaler Letalität (Franco et al., 2008; Holtz and Misra, 2008).

Die konditionale Deletion von *Srf* in der Bauchspeicheldrüse (**Pankreas**) beeinflusst zwar nicht die Entwicklung des Organs, führt jedoch zum späteren Zeitpunkt zur Entzündung und Zerstörung des exokrinen Drüsenanteils (Miralles et al., 2006).

Die Defizienz von SRF in der **Leber** führt zur verminderten Regenerationsfähigkeit nach operativer Entfernung von Leberanteilen, mit einhergehender verminderter IEG Expression (Latasa et al., 2007). Die Hepatocyten-spezifische Deletion von *Srf* führt zu einer verminderten Überlebensrate und kleineren Tieren, zu funktionalen Störungen der Leber und zur verminderten Leberzellproliferation (Sun et al., 2009).

Die Auswirkungen der konditionalen Deletion von *Srf* im **Gehirn** wird ausführlich im **Abschnitt 1.2.4** erläutert.

Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass die Deletion von *Srf* in den verschiedensten Geweben zu Störungen in der Dynamik des Zytoskeletts oder generell in der Kontraktilität führt.

1.2 Aufbau neuronaler Netzwerke in der Gehirnentwicklung

Das Nervensystem setzt sich aus zwei verschiedenen Zelltypen, den Neuronen und den Gliazellen zusammen. Neuronen sind auf Erregungsleitung spezialisierte Zellen und sind untereinander durch synaptische Verschaltungen zu einem komplexen Netzwerk verknüpft. Gliazellen des Zentralen Nervensystems (ZNS) lassen sich grob in Macroglia (Astrocyten und Oligodendrocyten) und Mikroglia unterteilen. Astrocyten sind sternförmige Zellen und regulieren v.a. den pH- und Ionenhaushalt im Gehirn und nehmen an der synaptischen Informationsverarbeitung teil. Oligodendrocyten bilden das Myelin, eine elektrische Isolationsschicht um die Axone von Neuronen. Mikroglia sind phagocytierende Zellen. Im Gegensatz zu den Neuronen und Macroglia, die durch assymetrische Zellteilung aus neuroepithelialen Stammzellen entstehen, stammen Mikroglia aus Vorläuferzellen des blutbildenden Systems.

Der Aufbau funktionstüchtiger neuronaler Netzwerke erfordert während der Gehirnentwicklung einen koordinierten Ablauf zellulärer Prozesse, wie Proliferation, Migration und Differenzierung. So müssen Neurone von ihrem Geburtsort zuerst in ihr Zielgebiet migrieren, wo sie sich oft in spezifische Schichten zusammenlagern. Anschließend bilden sie Nervenfortsätze (Neurite) aus, die sich zu Dendriten und einem Axon differenzieren. Die Axone müssen dann mit Hilfe ihres Wachstumskegels (einer sensomotorischen Struktur an der Spitze des Axons, die auf Signale der Umgebung reagieren kann) oft über weite Strecken ihre Zielzellen finden (= axonale Lenkung), mit denen sie schließlich synaptische Kontakte knüpfen. Auch Oligodendrocyten unterliegen erst einem Differenzierungsprozess, bevor sie die Fähigkeit zur Myelinisierung erwerben und damit zu einem funktionstüchtigen Netzwerk beitragen.

1.2.1 Neuronale Differenzierung im Hippocampus

1.2.1.1 Aufbau von Zell- und Faserschichten im Hippocampus

Der Hippocampus eignet sich als Modellsystem zur Untersuchung entwicklungsspezifischer Fragen im Aufbau neuronaler Netzwerke, da die einzelnen Zellen des Hippocampus und ihre synaptischen Verschaltungen anatomisch

detailliert beschrieben sind (Forster et al., 2006). Funktional betrachtet, ist der Hippocampus Teil des limbischen Systems und übernimmt eine wichtige Rolle bei Vorgängen der Gedächtniskonsolidierung (Überführung von Gedächtnisinhalten aus dem Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis), bei der Koordinierung von verschiedenen Gedächtnisinhalten und bei der räumlichen Orientierung.

Im Gegensatz zum sechsschichtig strukturierten Cortex ist der Hippocampus relativ einfach aufgebaut (**siehe Abb. 1.2A und Manuskript 3 Abb. 1**). Er besteht im wesentlichen aus zwei ineinandergreifenden C-förmigen Zellkörperschichten (**Abb. 1.2A, blaue Linie; Manuskript 3 Abb. 1A DAPI⁺**), die zum einen durch die Körnerzellen des Gyrus dentatus (DG) und zum anderen durch die Pyramidenzellen der CA-Region (*Cornu Ammonis*, Ammonshorn) gebildet werden (**Abb. 1.2A, einzelne Zellen sind in grün dargestellt**). Die CA-Region lässt sich in weitere Subregionen (CA1-CA3) unterteilen. Die Zellkörper der Körner- und Pyramidenzellen sind in kompakte Schichten organisiert. Ihre Dendriten und Axone bilden die zellarmen Schichten des Hippocampus (**Manuskript 3 Abb. 1A DAPI negativ**). Die Axone sind ebenfalls in kompakte Bündel organisiert, die von den Zellkörperschichten getrennt verlaufen. Diese Organisation von Zellen und Fasern in kompakte und voneinander getrennte Schichten (im Englischen „*lamination*“) ist auch in anderen wichtigen Hirnregionen, wie im Cortex und im Cerebellum wiederzufinden. Die Organisation von Zell- und Faserschichten scheint für die Gewährleistung neuronaler Funktionen essentiell zu sein, da in verschiedenen Studien oftmals eine Korrelation zwischen Defekten der Schichtenbildung und funktionalen Störungen (z.B. Epilepsie, Schizophrenie) aufgezeigt wurde (Haas et al., 2002; Nosten-Bertrand et al., 2008; Wenzel et al., 2001).

Der Hippocampus ist durch verschiedene Faserbahnen innerhalb seiner eigenen Regionen und mit anderen Hirnregionen, wie dem Cortex synaptisch verknüpft. Im nachfolgenden sind einige der wichtigsten Verschaltungen im Hippocampus genauer beschrieben: Im Gyrus dentatus enden zwei afferente Fasertrakte auf schichtenspezifische Art und Weise (**siehe Abb. 1.2A und B**). Zum einen enden im Gyrus dentatus die aus dem entorhinalen Neocortex stammenden afferenten glutamatergen Fasern des *Tractus perforans* (EC-Fasern) (**siehe Abb. 1.2A und B, graue Linie**). Die EC-Fasern bilden Synapsen mit den äußeren Dendritensegmenten der Körnerzellneurone. Zum anderen terminieren im Gyrus dentatus die kommissural assoziativen Fasern (C/A-Fasern) der Mooszellen, die im Hilus des ipsi- (gleiche

Hirnhälfte) und kontralateralen (der anderen Hirnhälfte) Hippocampus lokalisiert sind. Die C/A-Fasern bilden mit den proximalen Dendritensegmenten der Körnerzellen Synapsen (**siehe Abb. 1.2A und B, rote Linie; Manuskript 3 Abb. 1C, E**). Der Gyrus dentatus mit seiner kompakten Körnerzellschicht und den davon abgetrennten aufeinanderfolgenden Faserschichten von C/A- und EC-Fasern stellt damit ein besonders geeignetes Beispiel für den zell- und fasergeschichteten Aufbau im Hippocampus dar (**Abb. 1.2B**).

Des Weiteren bilden die Axone der Körnerzellen, die als Moosfasern bezeichnet werden, synaptische Verschaltungen mit den Pyramidenzellen der CA3-Region. Die Moosfasern spalten sich zunächst nach Austritt aus dem Gyrus dentatus in einen suprapyramidalen (oberhalb der CA-Region liegenden) und in einen infrapyramidalen (unterhalb der CA-Region liegenden) Ast auf (**siehe Abb. 1.9 und Manuskript 3 Abb. 1A**). Die beiden Äste vereinigen sich schließlich wieder oberhalb der CA-Region zu einem gemeinsamen Bündel und bilden Synapsen mit den apikalen Dendriten der CA3-Neurone. Auch hier verlaufen wiederum Zellkörper- und Faserschicht getrennt voneinander.

Weiterhin kontaktieren die Pyramidenzellen der CA3-Region *via* Schaffer Kollaterale die Pyramidenzellen der CA1-Region. Die CA1-Pyramidenzellen senden Kollaterale ins Subiculum und projizieren zurück in den Cortex. Die Verbindung zwischen Cortex, Gyrus dentatus, CA3 und CA1-Region, die durch den Tractus perforans, die Moosfasern und die Schaffer Kollaterale hergestellt wird, wird auch als trisynaptischer Schaltkreis bezeichnet.

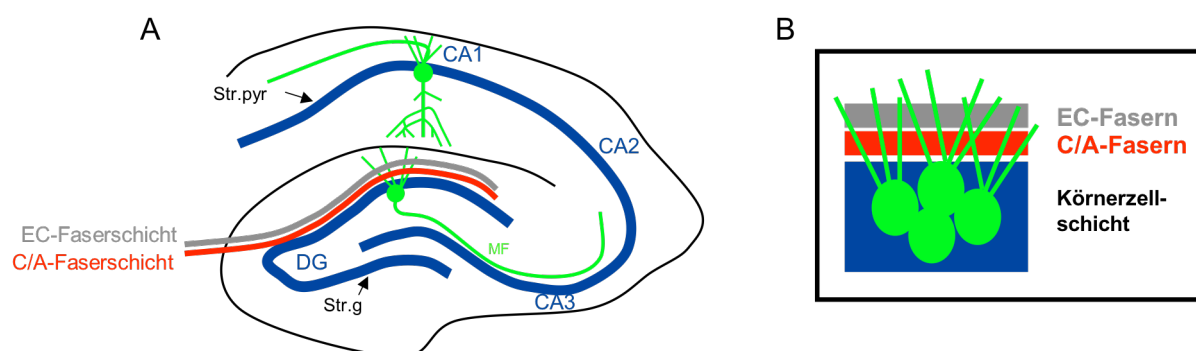


Abb. 1.2 Schematischer Aufbau des Hippocampus

(A) Der Hippocampus besteht im wesentlichen aus zwei ineinandergreifenden C-förmigen Schichten (blaue Linie), die durch die Körnerzellen (in grün) des Gyrus dentatus (DG) und die Pyramidenzellen (in grün) der CA-Region gebildet werden. Die kompakte Zellkörperschicht der Körnerzellen wird auch als *Stratum granulosum* (Str.g), die der Pyramidenzellen als *Stratum pyramidale* (Str.pyr) bezeichnet. Die Axone der Körnerzellen (MF = Moosfasern) bilden außerhalb der CA3-Region Synapsen mit den Dendriten der CA3-Pyramidenzellen. Zwei afferente Fasertrakte (EC-Fasern in grau, C/A-Fasern in

rot) terminieren in schichtenspezifischer Weise im DG und bilden mit Dendriten der Körnerzellneurone synaptische Kontakte aus.

(B) Körnerzell-, C/A- und EC-Faserschicht bilden im DG kompakte und voneinander abgetrennte spezifische Schichten. C/A-Fasern bilden mit den proximalen Dendritensegmenten der Körnerzellen Synapsen, während EC-Fasern mit den distalen Dendritensegmenten der Körnerzellen Synapsen bilden.

1.2.1.2 Dendritenmorphologie hippocampaler CA1-Neurone

Dendriten sind zytoplasmatische Ausläufer neuronaler Zellen und stellen den postsynaptischen Teil von Synapsen dar. In Pyramidenzellen weisen die Dendriten ein charakteristisches Verzweigungsmuster auf (Spruston, 2008). So lassen sich die Dendritenbäume von CA1-Pyramidenzellen in einen basalen und einen apikalen Dendritenbereich unterteilen (**siehe Abb. 1.3**). Basale Dendriten entspringen an der Zellkörperbasis der CA1-Neurone und projizieren ins *Stratum oriens* (Str.o). Die apikalen Dendriten verzweigen sich im *Stratum radiatum* (Str.r) und im *Stratum lacunosum-moleculare* (Str.l-m) auf komplexere Art und Weise. Man unterscheidet einen längeren senkrecht zur Oberfläche orientierten apikalen Hauptast, der sich im unteren Teil schließlich in zwei Äste aufspaltet. Diese verzweigen sich haarbüschelförmig in viele weitere Dendriten. Entlang des Hauptastes entspringen lateral ebenfalls einige Dendriten. Innerhalb der CA1-Zellkörperschicht findet kein laterales Dendritenwachstum statt.

Die komplexe Entwicklung der Dendriten von Pyramidenzellen ermöglicht der Zelle mit vielen verschiedenen Fasertrakten Synapsen zu bilden. Die unterschiedliche Morphologie der apikalen und basalen Dendritenbäume ist noch nicht genau verstanden, doch vermutet man, dass die verschiedenen Dendritendomänen synaptische Impulse unterschiedlich integrieren können (Spruston, 2008).

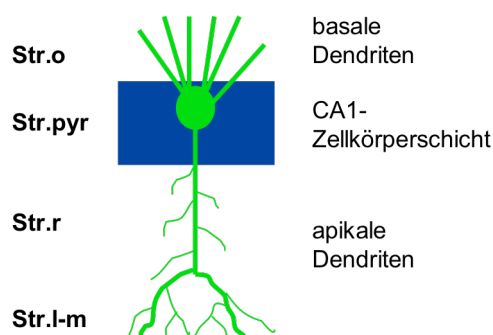


Abb. 1.3 Dendritenmorphologie hippocampaler CA1-Neurone

Str.o = *Stratum oriens*, Str.pyr = *Stratum pyramidale*, Str.r = *Stratum radiatum*, Str.l-m = *Stratum lacunosum-moleculare*. Zur Beschreibung der Dendritenstruktur siehe Text.

1.2.1.3 Dendritische Dornfortsätze („*spines*“)

Im Nervensystem sind die einzelnen Neurone über Synapsen in einem komplexen Netzwerk miteinander verknüpft. Synapsen bilden somit die Kontaktstellen zwischen Neuronen. An ihnen findet die Erregungsübertragung von einem Axon (präsynaptischer Teil) auf den Dendrit (postsynaptischer Teil) einer anderen Zelle statt. Die Dendriten von Pyramidenzellen sind mit zahlreichen Dornfortsätzen (im Englischen sog. *spines*) ausgestattet. Diese *spines* bilden im eigentlichen Sinne den postsynaptischen Teil einer Synapse und sind damit an der elektrischen Informationsaufnahme von Neuronen beteiligt. Dendritische *spines* äußern sich morphologisch als zytoplasmatische Ausstülpungen der dendritischen Membran mit einer Länge von ca. 0,2 – 1 μm und variieren in ihrer Struktur von kurz und stummelförmig über pilzförmig bis dünn und filamentös. Sie sind zudem sehr dynamische Strukturen (Yuste and Bonhoeffer, 2004). Anzahl und Morphologie von *spines* sind variabel und können durch verschiedene intrinsische und extrinsische Faktoren verändert werden (Lippman and Dunaevsky, 2005). So wurde u.a. gezeigt, dass die Aktivität von Glutamaterezeptoren, Ephrine und ihre Rezeptoren, Regulatoren des Zytoskeletts (z.B. Cofilin, Profilin und Rho-GTPasen), Adhäsionsmoleküle (z.B. α N-Catenin) und Astrocyten die Dichte und Morphologien dendritischer *spines* regulieren können (Bourne and Harris, 2008; Lippman and Dunaevsky, 2005). Desweiteren wurde in den letzten Jahren auch zunehmend eine Korrelation von Lern- und Gedächtnisprozessen und der Plastizität von *spines* diskutiert (Engert and Bonhoeffer, 1999; Yuste and Bonhoeffer, 2001). Neuronale Aktivität und das Aussetzen von Tieren in eine neue reizreiche Umgebung konnte die Anzahl an *spines* im Hippocampus verändern (Yuste and Bonhoeffer, 2001). Weiterhin wurde gezeigt, dass Formen synaptischer Plastizität die Dynamik von *spines* beeinflussen können (Yuste and Bonhoeffer, 2001). So führte die Induktion von LTP (*long term potentiation* = langandauernde Verstärkung synaptischer Übertragung) zu einer Zunahme der *spine* Anzahl und Größe (Engert and Bonhoeffer, 1999; Maletic-Savatic et al., 1999; Matsuzaki et al., 2004), während LTD (*long term depression* = dauerhafte Abschwächung der synaptischen Signalübertragung) zu einer Abnahme der *spine* Anzahl und Größe führte (Zhou et al., 2004). Zu- und Abnahme der *spine* Anzahl korrelierte gleichzeitig mit der Zu- und Abnahme der F-Aktin Menge in den *spines* (Dillon and Goda, 2005). Aktin ist die zytoskeletale Hauptkomponente der *spines* und gewährleistet durch rasche

Polymerisation und Depolymerisation die dynamischen Strukturveränderungen der *spines* innerhalb weniger Sekunden und Minuten (Fischer et al., 1998).

Die Dynamik der *spines* kann letztendlich z.B. über Veränderungen des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels zu Modifikationen in der synaptischen Übertragung führen (Segal, 2002) und stellt damit ein Beispiel für synaptische Plastizität im Gehirn dar.

1.2.2 Funktionen von Reelin in der Gehirnentwicklung

Die **Reeler Maus** Mutante wurde vor über 50 Jahren als Folge einer aufgetretenen Spontanmutation entdeckt (Falconer, 1951). Sie zeichnet sich durch auffällige motorische Störungen, wie Ataxie, Tremor und einem schwankenden Gang („*reeling gait*“) aus. Erst über 40 Jahre später konnte das für die Mutation der *Reeler Maus* verantwortliche Gen und das zugehörige Protein identifiziert werden (D'Arcangelo et al., 1995; Ogawa et al., 1995). Das **Reelin** Gen codiert für ein großes extrazelluläres Glykoprotein, das von speziellen Neuronen, den sog. Cajal Retzius-Zellen und von Interneuronen während der Gehirnentwicklung sekretiert wird. Reelin kontrolliert während der Gehirnentwicklung die Zellmigration von Neuronen entlang radialer Gliazellen und ist maßgeblich für den geordneten Aufbau der Zell- und Faserschichten im ZNS verantwortlich. Das Fehlen von Reelin führt im Cortex zu einem inversen Aufbau der einzelnen Schichten (Caviness, 1982; Rice and Curran, 2001). Im Hippocampus kommt es durch Reelin-Defizienz zu einer Dispersion der Körnerzellen, die mit einer gestörten Terminierung der kommissural/assoziativen Fasern einhergeht (**siehe Abb. 1.4B**) (Deller et al., 1999a; Gebhardt et al., 2002). Die Moosfasern in *Reeler* Mutanten weisen ebenfalls einen axonalen Lenkungsdefekt auf und wachsen innerhalb der CA3-Schicht (**siehe Abb. 1.4A**) (Stanfield and Cowan, 1979). Des Weiteren findet man im Hippocampus von *Reeler* Mutanten eine zweigeteilte CA1-Region (Stanfield and Cowan, 1979), reduziertes und falsch orientiertes Dendritenwachstum (**siehe Abb. 1.4C**) (Deller et al., 1999b; Niu et al., 2004; Stanfield and Cowan, 1979) und eine verringerte Anzahl an dendritischen Dornfortsätzen (*spines*) (**siehe Abb. 1.4D**) (Niu et al., 2008). Der Einfluss von Reelin auf das Dendritenwachstum wurde auch in verschiedenen *in vitro*-Studien gezeigt (MacLaurin et al., 2007; Niu et al., 2004).

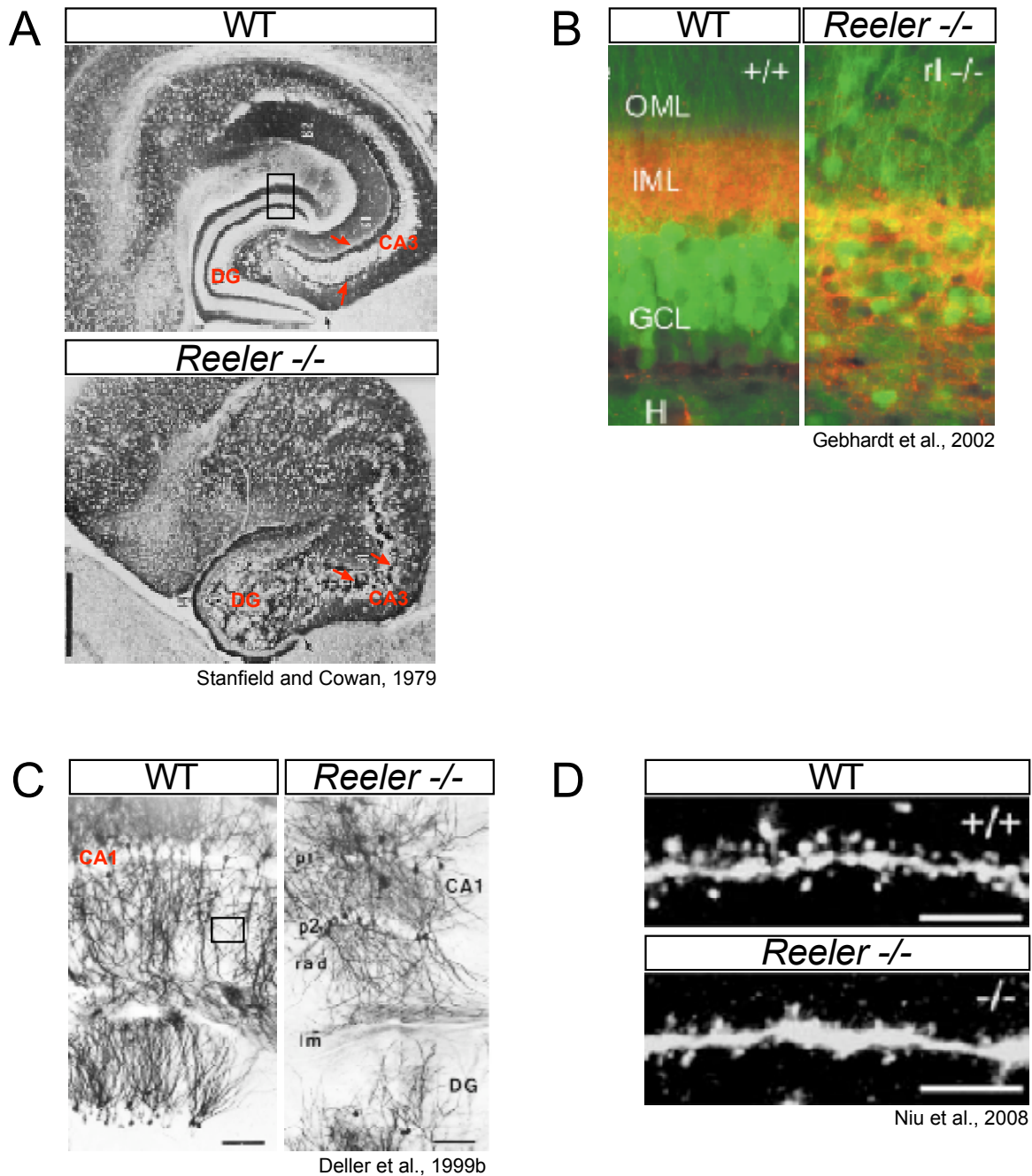


Abb. 1.4 Phänotypen im Hippocampus von *Reeler* Mutanten

Im Hippocampus von *Reeler* Mutanten findet man **(A)** eine Fehllenkung der Moosfasern, die innerhalb der CA3 Schicht navigieren, **(B)** eine Dispersion der Körnerzellen mit dazwischenliegenden C/A-Fasern, **(C)** eine zweigeteilte CA1-Schicht mit veränderten Dendritenmorphologie von CA1-Pyramidenneuronen und **(D)** eine Reduktion an dendritischen *spines* vor. Kasten in A markiert die ungefähre Lokalisation des in B gezeigten Ausschnittes, Kasten in C markiert die Lokalisation des in D gezeigten Ausschnittes.

Die Untersuchungen von weiteren Mausmutanten, die einen der *Reeler* Maus ähnlichen Phänotyp zeigten, führten zur Aufschlüsselung des **Reelin-Sinaltransduktionsweges** (siehe **Abb. 1.5**). Die Mutation im *disabled-1* (*Dab-1*)

Gen (Howell et al., 1997; Sheldon et al., 1997; Ware et al., 1997) und auch die Doppelmutation in den Genen der Lipoproteinrezeptoren ApoER2 (Apolipoprotein E Rezeptor 2) und VLDLR (*Very Low Density* Lipoproteinrezeptor) (Trommsdorff et al., 1999) führten zu einem *Reeler* identischen Phänotyp. Fehlte jeweils nur einer der beiden Rezeptoren, so waren die anatomischen Defekte in den Einzelmutanten nicht identisch und traten außerdem in abgeschwächten Formen auf, was auf unterschiedliche Signaltransduktionswege von Reelin hinwies. Später wurde aufgeklärt, dass ApoER2 und VLDLR als Reelin-Rezeptoren fungieren (D'Arcangelo et al., 1999; Hiesberger et al., 1999) und dass durch die Bindung von Reelin an diese Rezeptoren das intrazelluläre Protein Dab-1 phosphoryliert wird (Hiesberger et al., 1999; Howell et al., 1999). Die Phosphorylierung von Dab-1 wird durch Src Kinasen (Fyn und Src) vermittelt (Arnaud et al., 2003; Bock and Herz, 2003) und löst unterschiedliche intrazelluläre Signaltransduktionswege aus. Am Ende der Reelin-Signalkaskade stehen Proteine, die mit dem Zytoskelett assoziiert sind. Hierzu zählen z.B. die Mikrotubuli-assoziierten Proteine τ , (Hiesberger et al., 1999) und Lis-1 (Assadi et al., 2003). Die Phosphorylierung von Dab-1 bewirkt außerdem die Rekrutierung von Mitgliedern der Crk-Familie (CrkL, CrkI, CrkII), die wiederum zur Aktivierung der kleinen GTPase Rap-1 führen können (Ballif et al., 2004). Des Weiteren wurde gezeigt, dass Reelin die Phosphorylierung von Cofilin stimuliert und dadurch eine Stabilisierung des Zytoskelett bewirken könnte (Chai et al., 2009).

Cdk5 (*Cyclin-dependent kinase 5*) und seine aktivierenden Untereinheiten p35 und p39 sind ebenfalls als wichtige Regulatoren von Zellmigration bekannt und zeigen einige Ähnlichkeiten zum *Reeler* Phänotyp auf. Cdk5 wird wahrscheinlich nicht direkt durch Reelin aktiviert, wird aber als Protein betrachtet, dass parallel zu Reelin auf zahlreiche Substrate, wie τ oder Lis1 wirkt (Beffert et al., 2004). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Reelin neuronale Migration auch über die Aktivierung des Notch-Signalweges reguliert (Hashimoto-Torii et al., 2008; Sibbe et al., 2009).

Wie genau Reelin die Migration von Neuronen und die Schichtenbildung in den einzelnen Hirnarealen kontrolliert ist trotz Entschlüsselung einzelner Signaltransduktionswege aber noch unklar. Zum einen wurde Reelin als Stoppsignal für migrierende Neurone (Curran and D'Arcangelo, 1998; Frotscher, 1998; Pearlman and Sheppard, 1996), zum anderen auch als chemoattraktiver Faktor (Gilmore and Herrup, 2000) diskutiert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Reelin auf radiale Gliazellen wirkt, welche ein Gerüst für migrierende Neurone bilden (Forster et

al., 2002; Frotscher et al., 2003; Zhao et al., 2004). Darüber hinaus wurde Reelin auch als Faktor vorgeschlagen, der über die Bindung an Integrine die Ablösung migrierender Neurone von Gliazellen reguliert (Dulabon et al., 2000).

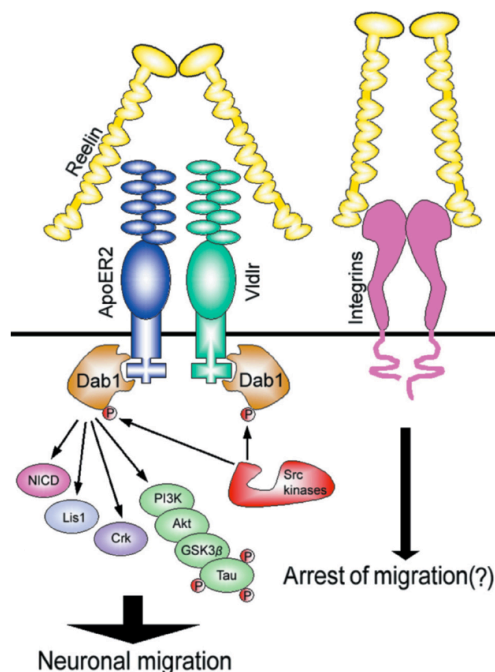


Abb. 1.5 Die Reelin-Signalkaskade (Abb. aus (Katsuyama and Terashima, 2009)).

Die Bindung von Reelin an die Rezeptoren ApoER2 und VLDLR führt zur Phosphorylierung von Dab-1 durch Src-Kinasen. Hierdurch werden verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, die die Dynamik des Zytoskeletts und damit auch neuronale Migrationsprozesse beeinflussen können. Desweiteren kann Reelin auch an Integrine binden. Für nähere Erläuterungen siehe Text.

1.2.3 Die axonale Myelinisierung im Zentralen Nervensystem

1.2.3.1 Aufbau und Funktion von Myelin

Im Laufe der Entwicklung neuronaler Netzwerke werden die Axone der Neurone von einer Isolationschicht, dem sog. Myelin umhüllt. Myelin besteht aus zahlreichen sich spiralförmig um Axone windende Plasmamembranschichten und wird von speziellen Gliazellen (siehe weiter unten) gebildet (Baumann and Pham-Dinh, 2001). Die Myelinisierung von Axonen sorgt für eine elektrische Isolierung der Axone und beschleunigt die Geschwindigkeit, mit der Nervenimpulse fortgeleitet werden. Da man bei myelinisierten Axonen spannungsgesteuerte Na^+ -Kanäle fast nur an den myelinfreien Zonen, den sog. Ranvierschen Schnürringen findet, wandert eine Depolarisation sehr schnell durch das Axon, da die Aktionspotentiale von einem

Schnürring zum nächsten Schnürring springen (saltatorische Erregungsleitung). Die Bedeutung der Myelinschicht wird durch demyelinisierende Erkrankungen, wie der multiplen Sklerose (MS) deutlich. Bei MS degenerieren die Myelinschichten um die Axone, wodurch die Weiterleitung der Nervenimpulse drastisch verlangsamt wird, und was letztendlich zu einem fortschreitenden Verlust der motorischen Koordination führt (Hauser and Oksenberg, 2006).

Im Gegensatz zu den meisten anderen Plasmamembranen, ist Myelin mit einem Lipidgehalt von ca. 70% eine besonders lipidreiche Membran. Glycosphingolipide, wie Galactosylceramid sowie Cholesterol bilden den Hauptlipidanteil des Myelins. Zu den Hauptproteinen des Myelins im ZNS gehören PLP (*Proteolipid Protein*) und MBP (*Myelin Basic Protein*). Daneben findet man noch eine Vielzahl an Proteinen, die in geringeren Mengen im Myelin vorkommen. Hierzu zählen u.a. MAG (*Myelin-Associated Glycoprotein*), CNP (*2'3'-Cyclic Nucleotide 3'Phosphodiesterase*) und MOG (*Myelin-Oligodendrocyte Glycoprotein*) (Baumann and Pham-Dinh, 2001).

Im Zentralnervensystem (ZNS) werden die myelinbildenden Gliazellen als Oligodendrocyten bezeichnet, im peripheren Nervensystem wird Myelin von den sog. Schwannschen Zellen gebildet. Schwannsche Zellen umhüllen nur jeweils ein Axon, Oligodendrocyten können dagegen mehr als über 50 Axone umhüllen.

1.2.3.2 Entwicklung von Oligodendrocyten

Die Myelinisierung von Axonen des ZNS beginnt in der Maus postnatal in den ersten Wochen nach der Geburt und erfordert die Differenzierung von unreifen Oligodendrocytenvorläuferzellen (OPCs= *oligodendrocyte precursor cells*) zu reifen myelinbildenden Oligodendrocyten (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Nicolay et al., 2007). OPCs entstehen aus den Neuroepithelzellen der ventrikulären/subventrikulären Zone. Von dort migrieren OPCs zu ihren Bestimmungsorten. Nach Erreichen ihrer Zielorte verlassen sie den Zellzyklus und differenzieren sich zu myelinisierenden Zellen. Die verschiedenen Stadien der Oligodendrocytendifferenzierung lassen sich durch Veränderungen im Migrations- und Proliferationsverhalten, sowie in der Morphologie der Zellen und durch die zeitlich begrenzte Expression verschiedener Markerproteine verfolgen (**siehe Abb. 1.6**).

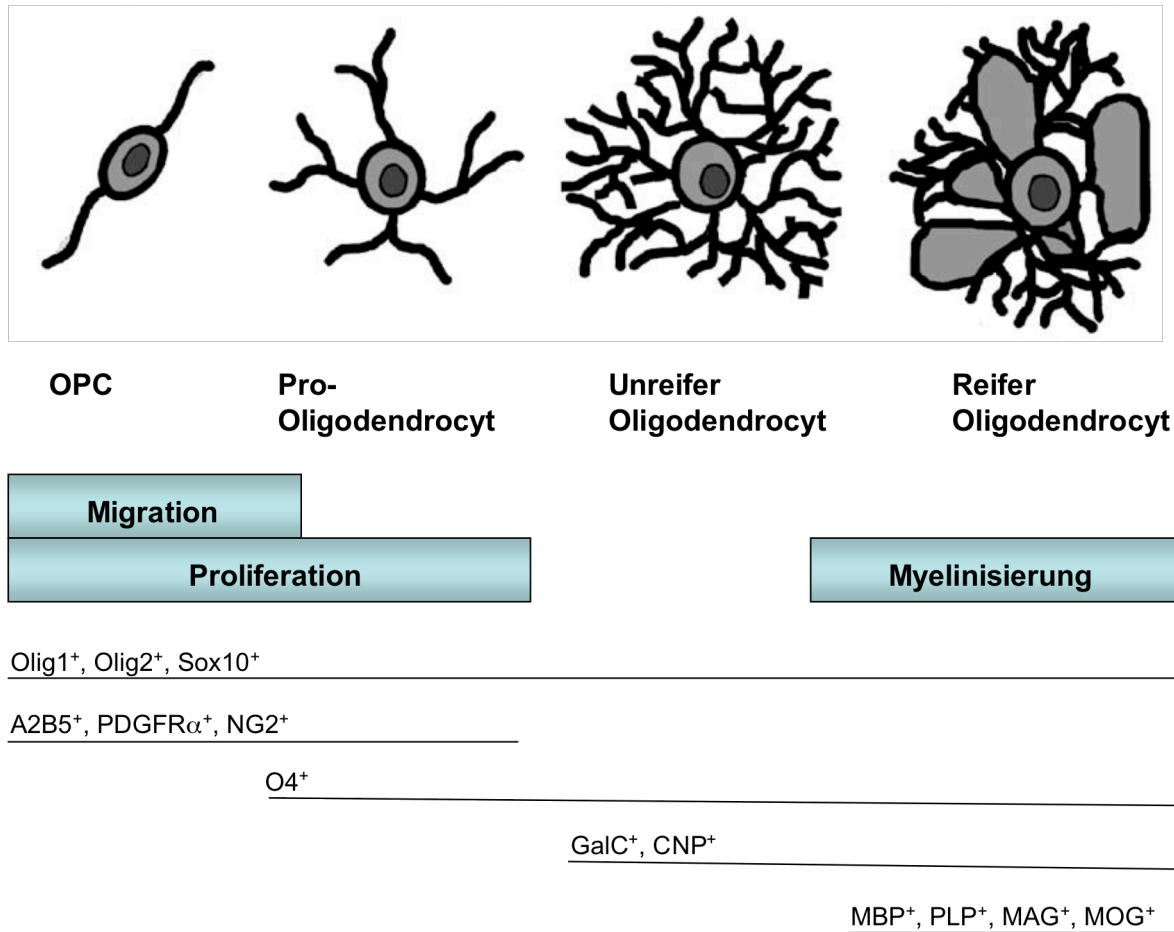


Abb. 1.6 Stadien der Oligodendrocytenentwicklung (modifiziert nach (Nicolay et al., 2007; Stangel and Hartung, 2002))

Die Differenzierung von Oligodendrocytenvorläuferzellen (OPCs) zu reifen myelinbildenden Oligodendrocyten ist mit Veränderungen in Migration, Proliferation, Morphologie und der Expression verschiedener Markerproteine verbunden, wodurch eine Einteilung der Oligodendrocytendifferenzierung in verschiedene Stadien möglich ist.

1.2.3.3 Neuronale Kontrolle der Oligodendrocytendifferenzierung

Die komplexe Entwicklung der Myelinisierung von Axonen erfordert einen zeitlich und örtlich genau regulierten Ablauf, der u.a durch die reziproke Kommunikation zwischen Gliazellen und Neuronen gewährleistet wird. Wie Studien in den letzten Jahren gezeigt haben, regulieren Neurone über sekretierte oder membranständige Signalmoleküle die Proliferation, Differenzierung und das Überleben von Oligodendrocyten (Barres and Raff, 1999; Nave and Trapp, 2008; Simons and Trajkovic, 2006). Auch die Myelinisierung selbst wird durch axonale Signale beeinflusst (Goto et al., 1990; Macklin et al., 1986; Scherer et al., 1992).

Im peripheren Nervensystem wird die Proliferation und Differenzierung der Schwannschen Zellen maßgeblich durch neuronale Signale kontrolliert (Jessen and

Mirsky, 2005). Die Kontrolle der Myelinisierung durch axonale Signale im ZNS wurde hingegen zunächst unterschätzt, da die Differenzierung von Oligodendrocyten in Zellkultur auch in der Abwesenheit von Neuronen relativ autonom ablief (Dubois-Dalcq et al., 1986; Mirsky et al., 1980). In den letzten Jahren wurden jedoch zahlreiche neuronale Signalmoleküle identifiziert, die die Entwicklung der Oligodendrocyten im ZNS beeinflussen (Simons and Trajkovic, 2006) (**siehe Abb. 1.7**). Hierzu zählen z.B. verschiedene Wachstumsfaktoren, wie PDGF-A, FGF-2, IGF-1, NT-3 und CNTF, die von Neuronen und Astrocyten freigesetzt werden, und die Proliferation und das Überleben von Oligodendrocyten regulieren (Baron et al., 2005; Barres et al., 1994; Miller, 2002). IGFs (*insulin growth factors*), wie IGF-1 fördern die Myelinisierung, während IGF-BPs (*insulin growth factor binding proteins*) als ihre Antagonisten wirken (Chesik et al., 2008). Des Weiteren wurde Neuregulin als ein von Neuronen präsentiertes Signalmolekül identifiziert, welches an ErbB-Rezeptoren in Oligodendrocytenmembranen bindet und dadurch Reifung, Überleben und Proliferation von Oligodendrocyten fördert (Canoll et al., 1996; Fernandez et al., 2000; Nave and Trapp, 2008; Park et al., 2001). Jagged 1 wurde als neuronaler Ligand gefunden, der durch die Bindung an den Notch1-Rezeptor die Differenzierung von Oligodendrocyten inhibiert (Wang et al., 1998). Auch die elektrische Aktivität von Neuronen übt einen Einfluss auf die Myelinisierung aus (Demerens et al., 1996) (**siehe Abb. 1.7**).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine Vielzahl an neuronalen Signalmolekülen auf parakrine Art und Weise auf die Entwicklung von Oligodendrocyten wirkt und damit die Myelinisierung von Axonen beeinflusst.

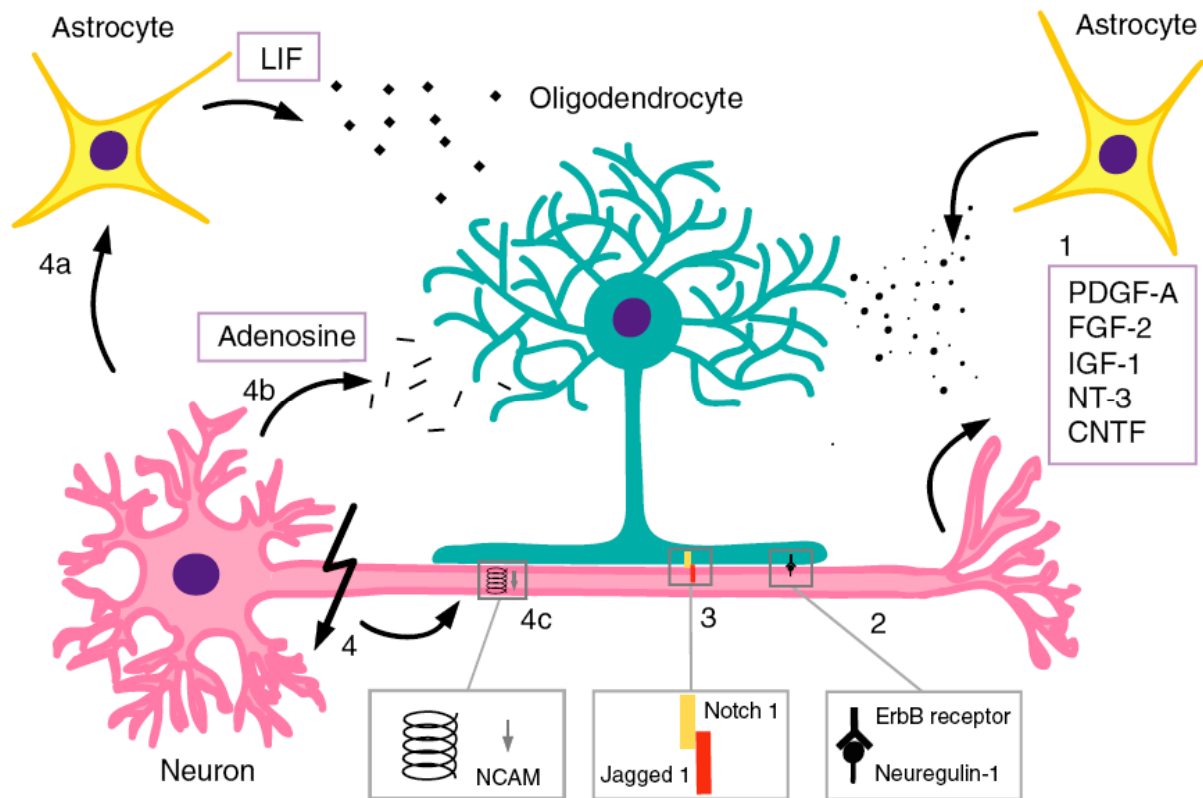


Abb. 1.7 Regulation der Oligodendrocytendifferenzierung und Myelinisierung durch neuronale Signalmoleküle (Simons and Trajkovic, 2006)

(1) Astrozyten und Neurone sekretieren zahlreiche Wachstums- und trophische Faktoren, wie PDGF, FGF-2, IGF-1, NT-3 und CNTF, die die Proliferation und das Überleben von Oligodendrocyten regulieren. (2) Membran-assoziierte oder lösliche Neureguline binden an ErbB-Rezeptoren in der Oligodendrocytenmembran und fördern das Überleben und die Reifung von Oligodendrocyten. (3) Interaktion von Jagged 1 mit dem Notch1-Rezeptor führt zur Inhibition der Oligodendrocytendifferenzierung. (4) Ein Anstieg neuronaler elektrischer Aktivität führt zur Freisetzung myelinfördernder Faktoren, wie LIF aus Astrozyten (4a) oder Adenosin aus Neuronen (4b) und zu Veränderungen in der Expression axonaler Zelladhäsionsmoleküle, z.B. NCAM, was das Fortschreiten der Myelinisierung bewirkt (4c).

1.2.4 Funktionen von SRF in der Gehirnentwicklung

SRF wird im Gehirn in nahezu allen Bereichen, u.a. im Cortex, Hippocampus, Striatum und Olfaktorischem Bulbus exprimiert (Alberti et al., 2005; Knoll et al., 2006; Knoll and Nordheim, 2009; Stringer et al., 2002) (siehe auch www.brain-map.org). Da die konstitutive Deletion von *Srf* bereits im frühen Embryonalstadium zum Tod führt (Arsenian et al., 1998), wurden um Funktionen von SRF im Gehirn analysieren zu können, vorderhirnspezifische konditionale *Srf* Mutanten hergestellt (Alberti et al., 2005; Etkin et al., 2006; Ramanan et al., 2005). In der Abteilung von Prof. A.

Nordheim, Universität Tübingen, erfolgte die Herstellung von konditionalen *Srf* Mutanten (Alberti et al., 2005) über die Kreuzung *Srf* „*gefloxter*“ Mausstämmen (Wiebel et al., 2002) mit *CamkII α -iCre* positiven Mäusen (Casanova et al., 2001) (siehe Abb. 1.8). Im „*gefloxten*“ *Srf* Allel (= *Srf-flex1* für *fl*oxed *e*xon1) wird das Exon1 von zwei loxP-Elementen (*locus of crossing over*) flankiert (Wiebel et al., 2002). LoxP-Elemente sind Erkennungssequenzen der Cre-Rekombinase (CRE = *c*auses/*c*yclization *r*ecombination), ein Enzym aus dem Bakteriophagen P1, wodurch das Exon1 des *Srf* Gens deletiert werden konnte. Durch die Klonierung des *Cre*-Gens hinter den *CamkII α* -Promotor erfolgte die Deletion von *Srf* vorderhirn- und neuronenspezifisch (Alberti et al., 2005; Casanova et al., 2001; Knoll et al., 2006). Die Aktivität des *CamkII α* -Promotors beginnt kurz vor der Geburt (Alberti et al., 2005; Casanova et al., 2001), so dass mit dieser Mutante frühe Entwicklungsprozesse in der Gehirnentwicklung untersucht werden können.

Diese konditionalen *Srf* Mutanten, die auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, besitzen als phänotypische Besonderheiten eine reduzierte Körpergröße, schwerwiegende motorische Störungen und sterben ca. 3 Wochen nach Geburt.

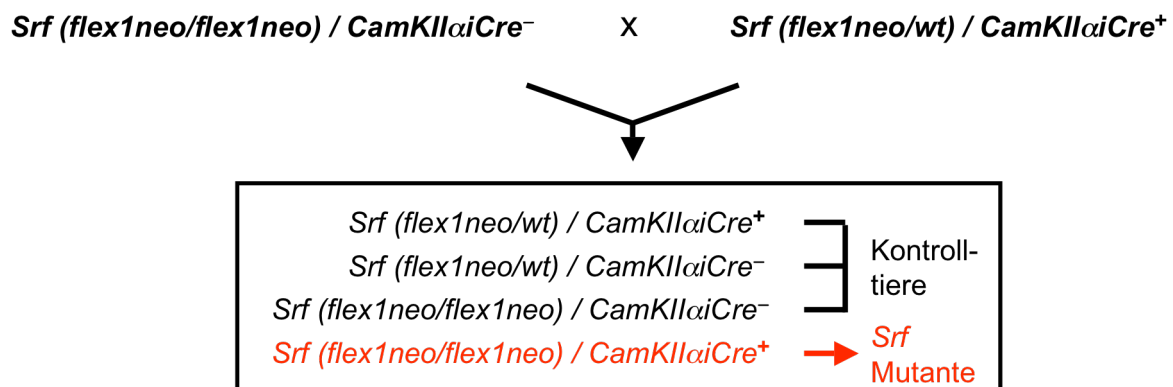


Abb. 1.8 Verpaarungsschema zur Gewinnung konditionaler *Srf* Mutanten

Durch die transkriptionelle Kontrolle von zytoskeletalen Genen, ist SRF als wichtiger Regulator des Aktinzytoskeletts bekannt (Miano et al., 2007). Da ein dynamisches Aktinzytoskelett die Grundlage für Motilität im Allgemeinen bildet, lag die Vermutung nahe, dass insbesondere auch neuronale Prozesse, wie neuronale Migration, Neuritenwachstum oder axonale Lenkung in den *Srf* Mutanten betroffen sein könnten. In der Tat konnte im Gehirn der oben beschriebenen *Srf* Mutanten Defekte

hinsichtlich Migration (Alberti et al., 2005), Neuritenwachstum und axonaler Lenkung (Knoll et al., 2006) festgestellt werden (**siehe auch Abb. 1.9**). So wurde zum einen gezeigt, dass SRF für die tangentielle Migration neuronaler Vorläuferzellen im RMS (*rostral migratory stream*) benötigt wird (Alberti et al., 2005). Im RMS wandern neuronale Vorläuferzellen von der Subventrikulären Zone zum Olfaktorischen Bulbus (Riechkolben), wo sie ihre Differenzierung zu Interneuronen durchlaufen. In den *Srf* Mutanten waren jedoch die meisten Vorläuferzellen nicht in der Lage aus der Subventrikulären Zone herauszuwandern. Parallel zum Migrationsdefekt wurden Veränderungen in der Genexpression und Phosphorylierung von zytoskeletalen Proteinen festgestellt, die möglicherweise den Migrationsdefekt mitverursachen: Die Expression von β -Aktin und Gelsolin war in den Mutanten reduziert und Cofilin wies eine verstärkte inhibitorische Phosphorylierung auf.

Zum anderen konnte gezeigt werden, dass SRF im Hippocampus bei der axonalen Lenkung der Moosfasern (**siehe Abb. 1.9**) eine Rolle spielt (Knoll et al., 2006). Wie bereits erwähnt spalten sich die Moosfasern der Körnerzellen normalerweise nach Austritt aus dem Gyrus dentatus in einen suprapyramidalen und in einen infrapyramidalen Ast auf, die sich schließlich wieder zu einem gemeinsamen Bündel zusammenschließen und letztendlich mit den Dendriten der CA3-Pyramidenzellen Synapsen bilden. In den *Srf* Mutanten findet die Aufspaltung der Moosfasern in zwei Äste nicht statt. Stattdessen penetrieren die Moosfasern in die CA3-Region und bilden innerhalb dieser Schicht mit den Zellkörpern CA3-Pyramidaler Neurone Synapsen. *In vitro*-Studien mit hippocampalen Neuronen zeigten außerdem, dass das Neuritenwachstum in SRF-defizienten Kulturen reduziert ist (Knoll et al., 2006). In axonalen Lenkungs-Assays, wie im Streifenassay und im Wachstumskegel-Assay zeigten SRF-defiziente Kulturen eine verminderte Sensitivität auf repulsiv wirkende Lenkungsmoleküle, wie Ephrin-A5. Im Wachstumskegelassay mit Ephrin-A5 zeigten SRF-defiziente Neurone keinen Wachstumskegelkollaps, sondern bildeten merkwürdige ringförmige Strukturen aus F-Aktin und Mikrotubuli, was auf eine gestörte Depolymerisationsdynamik von F-Aktin hinweist. Des Weiteren gingen die beschriebenen Veränderungen mit einer verminderten Expression von Genen, die für axonale Lenkungsmoleküle codieren (z.B. *Sema3c*, *EphA4*, *EphA7*) und mit einer Reduktion von F-Aktin einher.

Der Einfluss von SRF auf das Neuritenwachstum und auf die axonale Lenkung konnte auch im peripheren Nervensystem gezeigt werden. In konditionalen *Srf*

Mutanten, in denen *Srf* in sensorischen Spinalganglienzellen (DRG = *dorsal root ganglion*) ausgeschaltet war, wiesen die Axone dieser Zellen Defekte im Wachstum, im Verzweigen und in der Innervierung ihrer Zielzellen auf (Wickramasinghe et al., 2008).

Die Untersuchungen mit weiteren Mausmutanten, in denen *Srf* erst im adulten Stadium in neuronalen Zellen deletiert wurde, enthüllten wichtige Funktionen von SRF in aktivitätsinduzierter Genexpression, synaptischer Plastizität und in Lern- und Gedächtnisprozessen (Etkin et al., 2006; Ramanan et al., 2005) (**siehe Abb. 1.9**).

Die Genexpression von IEGs wie z.B. *c-Fos*, *FosB*, *Egr1*, *Egr2*, *Arc* und *ActB*, die z.B. durch elektrokonvulsiven Schock oder durch die Haltung der Tiere in einer neuen reizreichen Umgebung (sog. „*enriched environment*“) induziert werden kann, blieb in den *Srf* Mutanten aus (Ramanan et al., 2005). Die Langzeitpotenzierung (LTP = aktivitäts-induzierte langanhaltende Verstärkung synaptischer Effizienz, die für Lern- und Gedächtnisleistung von Bedeutung ist), die durch hintereinandergeschaltete kurze, kräftige elektrische Impulse (Tetanus-Stimulation) ausgelöst werden kann, war in den CA1-Pyramidenzellen dieser Mäuse ebenfalls vermindert. Die Arbeitsgruppe, um den Nobelpreisträger E. Kandel, die eine weitere konditionale *Srf* Mutante verwendete, konnte nach adulter *Srf*-Deletion nur geringfügige Veränderungen in der Langzeitpotenzierung beobachten (Etkin et al., 2006). Die Forscher stellten aber schwerwiegende Defekte in der Langzeit-Depression (LTD = *long term depression*, langanhaltende Abschwächung der synaptischen Signalübertragung) und der Expression LTD-assoziiierter Gene (z.B. *p35*, *Cdk5* und *Arc*) fest. Die Mäuse wiesen zudem Lern- und Gedächtnisstörungen auf. Sie waren nicht in der Lage, sich von einer neuen reizreichen Umgebung ein unmittelbares Gedächtnis aufzubauen. Daher zeigten die Mäuse keinerlei Habituation an eine neue Umgebung (Gewöhnung bzw. Interessenverlust an eine neue Umgebung, nachdem sie erkundet worden ist).

In beiden der zuletzt beschriebenen adulten *Srf* Mutanten wurden jedoch keine Beeinträchtigungen in Migration, axonaler Lenkung oder Neuronenmorphologie festgestellt, so dass die Ursache der verminderten Lern- und Gedächtnisleistungen, sowie der verminderten synaptischen Plastizität nicht auf diese Prozesse zurückgeführt werden kann.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass SRF sowohl in der frühen Gehirnentwicklung, als auch im adulten Gehirn wichtige Funktionen übernimmt (siehe Abb. 1.9).

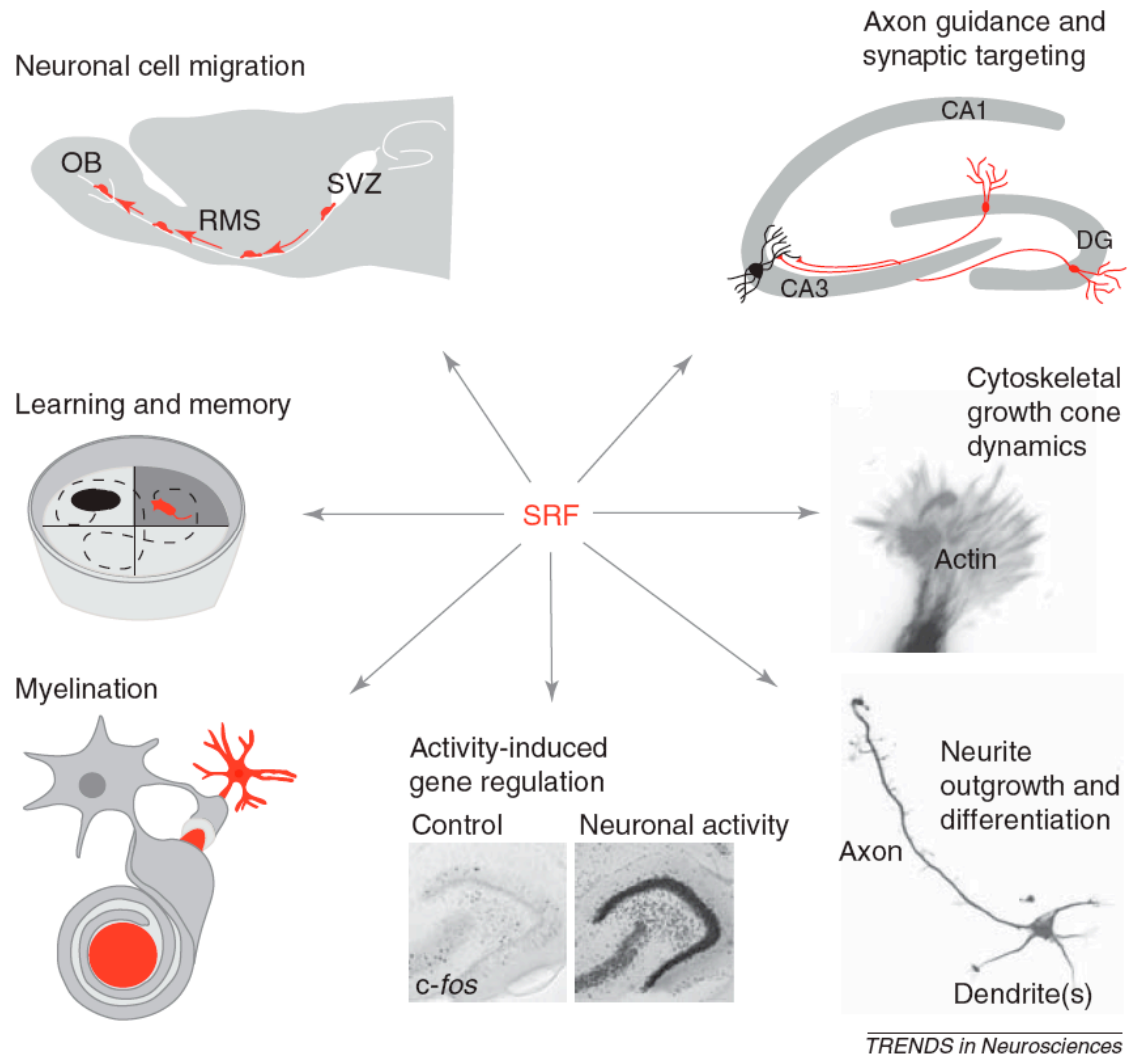


Abb. 1.9 Zusammenfassung bekannter SRF-Funktionen im Gehirn, Abb. aus (Knoll and Nordheim, 2009)

Nähere Erläuterungen siehe Text.

CA = *cornu ammonis*, Ammonshorn; DG = *dentate gyrus*, Gyrus dentatus; OB = *olfactory bulb*, Riechkolben; RMS = *rostral migratory stream*; SVZ = Subventrikuläre Zone.

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Der Transkriptionsfaktor SRF reguliert während der Gehirnentwicklung wichtige Prozesse, wie neuronale Migration (Alberti et al., 2005), axonale Lenkung und Synapsenbildung (Alberti et al., 2005; Knoll et al., 2006). Im adulten Gehirn beeinflusst SRF synaptische Plastizität und Lern- und Gedächtnisleistung (Etkin et al., 2006; Ramanan et al., 2005).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Suche nach Funktionen von SRF beim Aufbau von neuronalen Netzwerken während der Gehirnentwicklung erweitert und deren molekulare Mechanismen entschlüsselt werden.

Um neue Funktionen von SRF im Gehirn zu entdecken, wurden daher zum einen *GeneChips* eingesetzt. Hierdurch konnte die Genexpression auf genomweiter Ebene zwischen *Srf* Mutanten und Kontrolltieren verglichen werden. Auftretende Unterschiede in der Expression von Genen lieferten wichtige Hinweise auf neue Funktionen von SRF in der Gehirnentwicklung und wurden genauer untersucht.

Zum anderen sollte innerhalb dieser Arbeit die Rolle von SRF bei der Entwicklung von Zell- und Faserschichten im Hippocampus detaillierter untersucht werden. Der Hippocampus eignet sich als gutes Modellsystem für entwicklungsbiologische Fragestellungen, da die neuronalen Projektionen im Hippocampus bereits ausführlich beschrieben sind. Zusätzlich wies der axonale Lenkungsdefekt der Moosfasern bereits darauf hin, dass SRF an der Entwicklung des Hippocampus beteiligt ist und somit mit hoher Wahrscheinlichkeit auch bei der Ausbildung weiterer synaptischer Verschaltungen eine Rolle spielt.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien, Medien, Lösungen und Puffer

2.1.1.1 Allgemeine Chemikalien

Substanz	Bezugsquelle
Acrylamid 4K-Lösung 40% (PAA)	AppliChem
Agarose	Genaxxon
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem
Borax	Sigma
Borsäure	AppliChem
Bromphenolblau	AppliChem
BSA Fraktion V	AppliChem
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem
Essigsäure	AppliChem
Ethanol (EtOH)	Riedel-de Haën
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem
FCS (Fötale Kälber Serum)	PAA
Glucose	Sigma
Glycerin/Glycerol	AppliChem
Glycin	AppliChem
Hefeextrakt	AppliChem
Isopropanol	Fisher Scientific
L-Glutamine	Invitrogen
Magermilchpulver	AppliChem
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck
Methanol (MeOH)	Sigma
Moviol	Calbiochem
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth
Na ₂ EDTA	AppliChem
Natrium-Pyruvat	Invitrogen
Natriumchlorid (NaCl)	VWR Prolabo
Natriumdeoxycholat	AppliChem
Natriumdisulfit (Na ₂ S ₂ O ₅)	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem
Natriumfluorid (NaF)	AppliChem
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Sigma
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma

Natronlauge (NaOH)	AppliChem, Merck
Nonidet P40 Substitute (NP-40)	Fluka
n-propyl-Gallat	AppliChem
Paraformaldehyd (PFA)	AppliChem
PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung)	AppliChem
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen
Pferdeserum	Invitrogen
Phenylethylsulfonylfluorid (PMSF)	AppliChem
Ponceau S	Sigma
Salzsäure (HCl)	Roth
β -Mercaptoethanol (β -ME)	AppliChem
Sucrose	AppliChem
Tetranatriumdiphosphat ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$)	Merck
Trichloressigsäure	AppliChem
Triton-X-100	AppliChem
Trizma base	Sigma
Trypton	AppliChem
Tween-20	AppliChem
Wasserstoffperoxid (H_2O_2)	AppliChem

2.1.1.2 Materialien für die neuronale Zellkultur

HBSS (*Hanks' Balanced Salt Solution*) Invitrogen, #14170-138

Poly-L-Lysin Sigma

Laminin Sigma

Boratpuffer
 0,05 M Borsäure
 12,5 mM Borax
 pH 8,5, filtrieren, bei 4°C aufbewahren

DMEM-Medium
 (*Dulbecco Modified Eagle Medium*)
 DMEM + Glutamax (Invitrogen, #31966-047),
 Zugabe 10% Pferdeserum

Trypsin/EDTA (1x) Invitrogen

NMEM-Medium (neuronales MEM Medium)	1x MEM (Invitrogen, #21430-079) 1 mM Natrium Pyruvat 2 mM L-Glutamine 0,22% NaHCO ₃ 0,6% Glucose 2% B27 supplement (GIBCO™) steril filtrieren (0,22 µm-Filter, Millipore), bei 4°C aufbewahren, Zugabe Gentamicin 5 µg/µl (Invitrogen)
Zellkulturschalen	Becton Dickinson
Glas-Pasteurpipetten	Hirschmann
BDNF	Pepto Tech
Elektroporationsküvetten, -pipetten	Amaxa
<i>Mouse Neuron Nucleofactor Kit</i>	Amaxa

2.1.1.3 Materialien für die immuncytochemische Färbung

Deckgläschen	Menzel (Φ12mm)
4-, 6-, 24-well-Platten	Becton Dickinson
Fixierlösung	4% PFA 5% Sucrose in PBS
Permeabilisierungslösung	0,1% bzw. 0,2% Triton-X-100 in PBS
Blockierungslösung	2% BSA/PBS

	bzw. 5% FCS/0,05% Tween/PBS
DAPI	Applichem, 2 µg/ml
Texas Red-X Phalloidin	Molecular Probes, 1:100 in Blockierungslösung
Moviol	5 g Moviol/20 ml PBS, ü.N (über Nacht), rühren, 10 ml Glycerin zugeben, ü.N. rühren, zentrifugieren (15 min, 4000 rpm), Überstand abnehmen, Zugabe Spatelspitze n-propyl-Gallat, zentrifugieren (15 min, 4000 rpm), Überstand aliquotieren, bei -20°C lagern

2.1.1.4 Materialien für die immunhistochemische Färbung

„Quenching“ Lösung	49,5% (v/v) PBS 49,5% (v/v) Methanol 1% H ₂ O ₂
PBST	PBS mit 0,1% Tween-20
NGS (<i>normal goat serum</i>)	Vector, #S-1000
Blockierungslösung	PBST mit 5% (v/v) NGS bei CTGF-Färbung: PBST mit 5% (v/v) Pferdeserum
Vectastain ABC Kit Lösung	Vector, #PK-6100 ABC Reagenz A 1:100 ABC Reagenz B 1:100 in PBST

Peroxidasesubstratlösung	10% 1M Tris 10x pH 7,6 0,1% H ₂ O ₂ 89,4% H ₂ O 0,5% DAB (Sigma)
--------------------------	--

Entellan	Merck
----------	-------

Objektträger 76 x 26 mm	Menzel-Gläser Superfrost
-------------------------	--------------------------

Deckgläser 24 x 55 mm	Marienfeld
-----------------------	------------

2.1.1.5 Materialien für die HEK293- Zellkultur

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

Trypsin/EDTA (1x)	Invitrogen
-------------------	------------

Nährmedium	DMEM + Glutamax (Invitrogen, #31966-047) + 10% FCS (hitzeinaktiviert, sterilfiltriert) + Selektionsantibiotikum Geneticin (G418) 1:100 (Roth, stock 50 mg/ml)
------------	--

Fötale Kälber Serum (FCS)	PAA hitzeinaktiviert bei 55°C für 30 min
---------------------------	---

75 cm ² Zellkulturschalen	BD Falcon
--------------------------------------	-----------

Zellkulturmedium	DMEM + Glutamax (#31966-047) + 10% FCS (hitzeinaktiviert, sterilfiltriert)
------------------	---

Einfriermedium	Zellkulturmedium + 20% DMSO (sterilfiltriert)
----------------	--

Kryostatröhrchen	Simport
------------------	---------

Opti-MEM (<i>Reduced Serum Medium</i>)	Invitrogen, #11058-021
Falconröhrchen	BD Falcon
Amicon Zentrifugenröhrchen	Millipore, Ultra Zentrifugenröhrchen-100K

2.1.1.6 Materialien für die Genotypisierung

Schwanzlysepuffer	100 mM Tris pH 8,3 5 mM EDTA 0,2% SDS 200 mM NaCl 0,2 mg/ml Proteinase K (Genaxxon)
Red Taq DNA-Polymerase	Thermo Scientific
10x Red Taq PCR Puffer	Thermo Scientific
dNTP-Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Genaxxon, finale Konzentration 10 mM in dd H ₂ O, pH 7,0
Oligonukleotide	Sigma (Stammlsg.100 µM)

2.1.1.7 Materialien für die Agarose-Gelelektrophorese

GenAgarose LE	Genaxxon
DNA-Marker (100 bp + 1,5 kbp)	Genaxxon
50x TAE Puffer	2 M Tris-Base 1 M Eisessig 0,05 M EDTA pH 8,0

Ethidium Bromid	Stammlsg. 1% (w/v), 10mg/ml, Roth davon 1 µl/100 ml Agarosegel
-----------------	---

2.1.1.8 Materialien für die RNA-Isolierung

70% Ethanol

RLT-Puffer, (Zugabe 10 µl β-ME/ml RLT)	QIAGEN <i>RNeasy</i> [®] <i>Mini kit</i>
RW1-Puffer	
RPE-Puffer	
RNase-freies H ₂ O	

Zellschaber	Corning Incorporated
-------------	----------------------

HSW-Einmalspritzen 1ml	Fisher Scientific
------------------------	-------------------

HSW-Einmalkanülen 20Gx11/2	Fisher Scientific
----------------------------	-------------------

2.1.1.9 Materialien für den DNaseI-Verdau

10x DNaseI Puffer	0,4 M Tris/HCl pH 7,5 0,1 M NaCl 60 mM MgCl ₂
-------------------	--

DNaseI, RNase frei	Roche
--------------------	-------

2.1.1.10 Materialien für die cDNA-Synthese

<i>Random Hexamers</i>	Sigma (100 µM Stammlsg.)
------------------------	--------------------------

M-MLV Reverse Transkriptase	Promega (200 U/µl)
-----------------------------	--------------------

5x MLV-RT Puffer	Promega
RNase Inhibitor	Fermentas (40 U/μl)
dNTP's	Genaxxon

2.1.1.11 Materialien für die RT-PCR

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

2.1.1.12 Materialien für Affymetrix *GeneChips*

GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array, Affymetrix

restl. Materialien wurden aus dem Labor von M. Schmid, MPI Tübingen gestellt

2.1.1.13 Materialien zur Gewinnung von Proteinextrakten

Protein-Lysepuffer	50 mM Tris pH 7,4
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
	1% Triton X-100
	1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)
	1 mM Na ₃ VO ₄
	1 mM NaF

1 mM Na₄P₂O₇

1x Proteaseinhibitor-Mix (Roche)

2.1.1.14 Materialien für die Proteinbestimmung nach Bradford

Bradford Reagenz

Bio-Rad Protein Assay

2.1.1.15 Materialien für die SDS-PAGE

4x Trenngelpuffer

1,5 M Tris/ HCl pH 8,8
0,4% SDS

2x Sammelgelpuffer

0,25 M Tris/ HCl pH 6,8
0,2% SDS

10% Trenngel

1x Trenngelpuffer
10% PAA
0,1% SDS
0,075% TEMED
0,05% APS

4% Sammelgel

1x Sammelgelpuffer
4% PAA
0,1% SDS
0,1% TEMED
0,05% APS

SDS-Gelelektrophoresepuffer

25 mM Tris/HCl pH 8,3
192 mM Glycin
0,1% SDS

6x Ladepuffer

300 mM Tris pH 6,8
600 mM β-ME (14,3 M)

	6% SDS
	60% Glycerol
	Bromphenolblau
<i>prestained protein ladder</i>	SM0671, Fermentas

2.1.1.16 Materialien für den Western Blot

<i>Blotting</i> -Puffer	25 mM Tris-HCl pH 8,3 192 mM Glycin 20% (v/v) Methanol
1x TBST	50 mM Tris-HCl pH 8 150 mM NaCl 0,1% (v/v) Tween-20
PVDF Membran	Immobilion-P (0,45µm), Millipore
Blockierlösung	1x TBST mit 5% Magermilchpulver
Ponceau S-Färbelösung	0,02% Ponceau S 0,3% Trichloressigsäure
Pierce®ECL Western Blot Substrat	Thermo
Filme	CEA

2.1.1.17 Materialien für den Pulldown Assay

IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)	Applichem
LB-Medium	1% Trypton

	0,05% Hefeextrakt 1% NaCl in H ₂ O lösen, pH 7,2-7,5 einstellen mit 1M NaOH, autoklavieren und bis Gebrauch bei 4°C lagern
Ampicillin	Applichem
Glutathione Sepharose® 4B	Amersham Herstellung einer 50% Slurry nach Angaben des Herstellers
<i>Bacterial Lysis Puffer</i>	20% Sucrose 10% Glycerol 50 mM Tris pH 8,0 0,2 mM Na ₂ S ₂ O ₅ 2 mM MgCl ₂ 2 mM DTT frisch dazugeben: auf 20 ml Puffer 1 ml 25x Protease Inhibitor-Lösung (Roche)
<i>GST-Fish Puffer</i>	10% Glycerol 50 mM Tris pH 7,4 100 mM NaCl 1% NP-40 2 mM MgCl ₂ frisch dazugeben: auf 1 ml Puffer 50 µl 25x Protease Inhibitor-Lösung
modifizierter RIPA Puffer	50 mM Tris pH 7,2 1% Triton-X-100 0,5% Sodium Deoxycholate (lichtgeschützt) 0,1% SDS

500 mM NaCl
 10 mM MgCl₂
 1 mM PMSF
 frisch dazugeben: auf 1 ml Puffer 50 µl 25x
 Protease Inhibitor-Lösung

2,6x sample buffer

4 ml H₂O
 1 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
 0,8 ml Glycerol
 1,6 ml 10% SDS
 0,4 ml β-ME
 0,2 ml Bromphenolblau 0,05%

2.1.2 Antikörper

2.1.2.1 Primäre Antikörper für die Immunhistologie

Antigen	Herkunft	Referenz	Verdünnung
APP	Maus, monoklonal	Chemicon	1:100
Aldh1L1	Kaninchen	bekommen von Dr. S. Krupenko, Medical University of South Carolina, USA	1:1000
Calbindin	Maus, monoklonal	Swant	1:500
Calretinin	Kaninchen, polyklonal	Swant	1:5000
Cre	Kaninchen	BD	1:1000
Ctgf	Ziege, polyklonal	Santa Cruz	1:1000
GFAp	Maus, monoklonal	Sigma, clone G-A-5	1:1000
Map2	Kaninchen, polyklonal	Chemicon	1:1000
MBP	Maus, monoklonal	Covance	1:1000
NFAP	Maus	DSHB, clone 3A10	1:25
Ng2	Kaninchen, polyklonal	Chemicon	1:400
Olig1	Kaninchen, polyklonal	Chemicon	1:1000
Olig2	Kaninchen, polyklonal	Chemicon	1:1000
PdgfR α	Kaninchen, polyklonal	Lab Vision	1:100-1:300
PLP	Kaninchen	bekommen von Dr. KA Nave, MPI Göttingen	1:1000
Reelin	Maus, monoklonal	Chemicon, clone G10	1:1000
Smi32	Maus, monoklonal	Covance	1:1000
Sox10	Meerschweinchen, polyklonal	bekommen von Dr. M Wegner, Uni Erlangen-Nürnberg	1:1000
SRF	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz	1:500

2.1.2.2 Primäre Antikörper für die Immuncytochemie

Antigen	Herkunft	Referenz	Verdünnung
classIII β -Tubulin	Maus, monoklonal	Covance	1:1000
β -Tubulin	Maus, monoklonal	Sigma	1:5000
VP 16	Kaninchen, polyklonal	Abcam	1:5000

2.1.2.3 Primäre Antikörper für den Western Blot

Antigen	Herkunft	Referenz	Verdünnung
Gapdh	Maus, monoklonal	Acris	1:50.000
Map2	Kaninchen, polyklonal	Chemicon	1:2000
Reelin	Maus, monoklonal	Chemicon, G10	1:1000

2.1.2.4 Primäre Antikörper für den Rho Pulldown Assay

Antigen	Herkunft	Referenz	Verdünnung
RhoA, B, C	Maus, monoklonal	Upstate, clone 55	1:500

2.1.2.5 Sekundäre Antikörper

Sekundäre Antikörper	Herkunft	Referenz	Verdünnung
α -Kaninchen IgG-HRP	Esel	Amersham	1:5000 (Western Blot)
α -Maus IgG-HRP	Schaf	Amersham	1:5000 (Western Blot)
α -Kaninchen IgG-biotinyliert	Ziege	Vector Laboratories	1:500 (Immunhistologie)
α -Ziege IgG-biotinyliert	Kaninchen	Vector Laboratories	1:500 (Immunhistologie)
α -Maus IgG-biotinyliert	Ziege	Vector Laboratories	1:500 (Immunhistologie)
α -Kaninchen IgG-Alexa488	Ziege	Molecular Probes	1:300 (Immuncytochemie) 1:1000 (Immunhistochemie)
α -Kaninchen IgG-Alexa546	Ziege	Molecular Probes	1:300 (Immuncytochemie) 1:1000 (Immunhistochemie)
α -Maus IgG-Alexa488	Ziege	Molecular Probes	1:300 (Immuncytochemie) 1:1000 (Immunhistochemie)
α -Maus IgG-Alexa546	Ziege	Molecular Probes	1:300 (Immuncytochemie) 1:1000 (Immunhistochemie)
α -Ziege IgG-Alexa488	Esel	Molecular Probes	1:1000 (Immunhistochemie)
α -Meerschweinchen Cy3	Ziege	Molecular Probes	1:200 (Immuncytochemie)

2.1.3 Oligonukleotide

2.1.3.1 Primer für die Genotypisierung

Genotypisierung	Primer	Sequenz in 5'→3' Richtung g
<i>Srf</i>	A W B W C W	AGT TCA TCG ACA ACA AGC TGC G G GAG ATT TCC ACA GAA AGC AAC G G TGA TAT TGC TGA AGA GCT TGG CGG C
<i>CamKIIαCre</i>	CreS CreAS PCR3 PCR4	ATG CGG TGG GCT CTA TGG CTT CTG TGC ACA CCT CCC TCT GCA TGC A C G AAG AAG GGT CCG GCC CCG AAG ATG CTG G G C CTG GAT GCC CTC TCC TTC CCC GGA GCC CTG
<i>Thy1-GFP</i>	GFP fw GFP rev IL-2 fw IL-2 rev	AAG TTC ATC TGC ACC ACC G TTC TTG AAG AAG ATG GTG C G CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C
<i>Reelin</i>	Reln rev-wt Reln rev-rl Reln fw-wt	CAG TTG ACA TAC CTT AAT TGC ATT AAT GTG CAG TGT TAA TCT GTC CTC ACT CTG C C

2.1.3.2 Primer für die RT-PCR

Primer für RT-PCR	Sequenz in 5'→3' Richtung g
<i>Acta2 fw</i> <i>Acta2 rev</i>	CAG CAA ACA GGA ATA CGA CGA A TGT GTG CTA GAG GCA GAG CAG
<i>ApoER2 fw</i> <i>ApoER2 rev</i>	ACA ACC ATC CAC GAC CCT ACC AGG GAC GTT AAC CGA GTG A G G
<i>Arc fw</i> <i>Arc rev</i>	GCA CAA AAG CCA TGA CCC AT TCT CCC TAG TCC CCA GGG
<i>Cdk5 fw</i> <i>Cdk5 rev</i>	GGC CAA GCT GTA CTC CAC GT TAG CCA GCT CTG CAA AGA TG C
<i>c-Fos fw</i> <i>c-Fos rev</i>	CCT GCC CCT TCT CAA CGA C GCT CCA CGT TGC TGA TGC T
<i>Claudin11 fw</i> <i>Claudin11 rev</i>	TCA TGG CCA CTG GTC TCT ACC TGC ACG TAG CCT GGA AGG A
<i>CNPase fw</i> <i>CNPase rev</i>	TAA CCC TCC CTT AGC CCC TG TCC CTA GCA TGT GGC AGC T
<i>Crk fw</i> <i>Crk rev</i>	ATC CGG GAT AAG CCT GAA GAG TCT CCA CGT AAG GGA CAG GAA T
<i>Crkl fw</i> <i>Crkl rev</i>	AAC TCG CGT GTC TCG CAC TA TCC TGG TCC CCG ATC TTA AA
<i>Ctgf fw</i> <i>Ctgf rev</i>	CAC TGC CAA AGA TGG TGC AC TTT GGA AGG ACT CAC CGC TG
<i>Cyr61 fw</i> <i>Cyr61 rev</i>	CGC GAG TTC TTT TCA ACC CT CCA AGA CGT GGT CTG AAC GA

<i>Dab1 fw</i>	GCC AAG AAA GAC TCC AGG AAG A
<i>Dab1 rev</i>	GGA CCC CTT CGC CTT TAA A C
<i>Dcx fw</i>	AAGCACAAGGACCTGTACCTGC
<i>Dcx rev</i>	TTGAGCGAAAGTATTCTGCTACAATAA
<i>Egr-1 fw</i>	GCC GAG CGA ACA ACC CTA T
<i>Egr-1 rev</i>	TCC ACC ATC GCC TTC TCA TT
<i>Egr-2 fw</i>	GTT GAC TGT CAC TCC AAG AAA TG G
<i>Egr-2 rev</i>	AGC GCA GCC CTG TAG GC
<i>Erb3 fw</i>	GCA ACC TGG ACT TCC TCA TC A
<i>Erb3 rev</i>	AGC TTT TCC GGG TCC AGT G
<i>Flna fw</i>	CGC GCC TCA AAA TGA GTA G C
<i>Flna rev</i>	AAT CGA TAC TGC CTC CCG G
<i>Gapdh fw</i>	TGG ATC TGA CGT GCC G C
<i>Gapdh rev</i>	TGC CTG CTT CAC CAC CTT C
<i>Hes5 fw</i>	CTC CAG AGC TCC AGG CAT G
<i>Hes5 rev</i>	GTC GGT TTT TCT CCT TGG G A C
<i>Lis1 fw</i>	ACA GAC ATT CCA GTG CCA CCT AT
<i>Lis1 rev</i>	ACA CAA ACC AAC CTG CAG CTT
<i>Mag fw</i>	GAG CCA CTG CCT TCA ACC TG
<i>Mag rev</i>	GCC GCT GCA CAG TGT GAC T
<i>Mal fw</i>	GGT GAG ATC GAA ATG TGC CC
<i>Mal rev</i>	CCG CTG GGT GTG TTA ATG TG
<i>Mbp fw</i>	ACT TCC AGG CCA GCT ATC C C
<i>Mbp rev</i>	CCC TTT CCT TCC CTC TGC C
<i>Mobp fw</i>	GGT TTC ATC TGG AGC CCC TT
<i>Mobp rev</i>	ATC ACC TTT GCC AAA GAC CCT
<i>Mog fw</i>	GAG TGG TTC ACC TCT ACC GAA ATG
<i>Mog rev</i>	CTG TGC GTC CCC GGT ATT C
<i>p35 fw</i>	TGC GCG AAC CCA AAA GAT
<i>p35 rev</i>	GTA CAG GTG ACA TGG GCA AGT C
<i>p53 fw</i>	CAC CCT TCA GAT CCG TGG G
<i>p53 rev</i>	TGA GTT CCA AGG CCT CAT TCA
<i>Plp1 fw</i>	GGC TAG GAC ATC CCG ACA AG
<i>Plp1 rev</i>	GCA AAC ACC AGG AGC CAT A CA
<i>Psd95 fw</i>	GTT TGG ATC CTG TGT CCC TC A
<i>Psd95 rev</i>	CCG GGA GGA GAC AAA GTG GTA
<i>Reelin fw</i>	GGC GAT GCC CTG GTC TTT A
<i>Reelin rev</i>	AGT CTG TGA CTG AGC AGG AGG C
<i>Srf (exon4) fw</i>	TGT GCA GGC CAT TCA TGT G
<i>Srf (exon5) rev</i>	ACA GAC GAC GTC ATG ATG GTG
<i>Tpm2b fw</i>	AATGCCATCGACCGCG
<i>Tpm2b rev</i>	AGCTGCTTGCATCGGTCTTC
<i>Ugt8a fw</i>	TTT TCA AGA CAC TAG CAT CGG C
<i>Ugt8a rev</i>	TGC CTT CTG AGA GGA GGA GC
<i>Vldlr fw</i>	GAC GGA GCC AAG AGG AAG TT C
<i>Vldlr rev</i>	CGA CAA CGG ATC CAC AGC TA

2.1.4 Mausstämme

<i>CamKIIα-iCre</i>	AG Prof. Dr. G. Schütz, DKFZ Heidelberg
<i>Srf(flex1neo/flex1neo)</i>	AG Prof. Dr. A. Nordheim, Uni Tübingen
<i>Srf(flex1neo/flex1neo) CamKIIα-iCre</i>	AG Prof. Dr. A. Nordheim, Uni Tübingen
<i>Thy1-GFP-M</i>	Dr. J. Sanes, Harvard University
<i>Reeler</i>	Prof. Dr. M. Frotscher, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Uni Freiburg

2.1.5 Viren

SRF-VP16 Δ MADS - Adenoviren	Vector Biolabs , 4,9 x 10 ¹² PFU/ml
SRF-VP16 - Adenoviren	Vector Biolabs , 4,6 x 10 ¹² PFU/ml

2.1.6 Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Bezugsquelle
SRF-VP16	codiert für ein Fusionsprotein aus WT-SRF und viraler VP16 Transaktivierungsdomäne, konstitutiv aktive Form von SRF	Schratt et al., 2002
SRF-VP16 Δ MADS	SRF-VP16 Konstrukt mit deletierter MADS-Box, daher inaktive Form von SRF	Schratt et al., 2002
p3DA-d2EGFP	3 SRF-Bindestellen des c-Fos Promotors vor einem GFP Reporter gen	Dr. G. Posern, MPI München

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Herstellung primärer neuronaler Zellkulturen der Maus

2.2.1.1.1 Säurevorbehandlung von Deckgläschen

Zellen für immunocytochemische Färbungen wurden auf Deckgläschen (Ø12 mm) ausplattiert. Zum Säubern der Deckgläschen und für eine bessere Haftung von Poly-L-Lysin (PLL) wurden die Deckgläschen zuvor einer Säurebehandlung unterzogen. Dazu wurden sie für 1 h in 2 M NaOH gelegt und anschließend dreimal mit H₂O gewaschen. Nach einer weiteren Behandlung mit HNO₃ (70%) für mind. drei Tage wurden sie wieder dreimal gewaschen. Danach wurden sie für mind. 1 h mit 9 M (37%) HCl behandelt und anschließend innerhalb 24 h zehnmal gewaschen. Abschließend wurden sie in 100% EtOH gelegt und einmal mit H₂O gewaschen. Die Deckgläschen wurden in 70% EtOH aufbewahrt und vor dem Gebrauch luftgetrocknet.

2.2.1.1.2 Beschichtung von Deckgläschen und Zellkulturschalen

Die säurevorbehandelten Deckgläschen (DG) wurden unter UV-Licht sterilisiert und als „Sandwich“ mit 50 µl Poly-L-Lysin in Borat-Puffer (100 µg/ml) für 1 h bei 37°C beschichtet. Zellkulturschalen (6-well Platten) wurden mit 10 µg/ml Poly-L-Lysin in Borat-Puffer beschichtet. Nach dreimaligem Waschen der Deckgläschen oder Zellkulturschalen mit H₂O, wurden sie für mind. 2 h mit Laminin in HBSS beschichtet (DG mit 20 µg/ml, 6-well Platten mit 2-5 µg/ml; Laminin wurde vorher langsam auf Eis aufgetaut). Anschließend wurde dreimal mit HBSS gewaschen und die Deckgläschen in 4-well oder 24-well Platten überführt. DG und Zellkulturschalen wurden bis zum Gebrauch (ca. 2-3 h) bei 37°C in DMEM/10% Pferdeserum inkubiert. Direkt vor dem Gebrauch wurde das Medium gegen NMEM/B27 mit 5 µg/µl Gentamicin ausgetauscht.

2.2.1.1.3 Präparation und Herstellung neuronaler Primärkulturen

Hippocampale Kulturen wurden aus P1/P2-Mäusen (P1 = postnataler Tag 1) gewonnen. Für die Herstellung corticaler Kulturen wurden E17,5 Embryonen verwendet. Hierfür wurde das Muttertier mit CO₂ getötet und die Embryonen entnommen.

P1/2-Mäuse bzw. Embryonen wurden dekapitiert und der Kopf wurde in kaltes 1x PBS überführt. Ein kleines Stück Schwanz wurde für die Genotypisierung (siehe 2.2.2.1) abgeschnitten. Der Kopf wurde für die Präparation in eine Schale mit HBSS (Raumtemperatur) überführt und die Schädeldecke wurde aufgeschnitten. Die Kopfhaut wurde abgezogen und das Gehirn vorsichtig herausgehoben. Durch einen Coronalchnitt wurde zunächst das optische Tektum und das Cerebellum entfernt. Anschließend wurde das Gehirn sagittal zwischen beiden Cortices in zwei Hälften geschnitten. Für corticale Kulturen wurden die beiden Cortices freipräpariert, dabei wurden Riechkolben, Striatum und ventrale Hirnteile (unterhalb des Hippocampus) entfernt. Für hippocampale Kulturen wurde der Hippocampus freipräpariert, der als röhrenförmige Struktur sichtbar war.

Bis zur Beendigung der Präparation aller Mäuse, wurden Hippocampi bzw. Cortices in HBSS aufbewahrt.

Um aus den isolierten Hippocampi bzw. Cortices Zellkulturen herzustellen, wurde das Gewebe zunächst für 10 min bei 37°C trypsinisiert und die Trypsinierung anschließend durch zweimaliges Waschen mit vorgewärmten HBSS abgestoppt. Das Gewebe wurde dann in 1 ml vorgewärmten DMEM/10% Pferdeserum resuspendiert und trituriert, um die Zellen aus dem Gewebeverband herauszulösen. Das Triturieren erfolgte mit Hilfe abgeflammter Pasteurpipetten. Durch das Abflammen der Pasteurpipetten wurden scharfe Kanten geglättet und der Durchmesser der Pipettenöffnung konnte verkleinert werden. Das Gewebe wurden zuerst 1 min lang mit einer Pasteurpipette mit vollem Durchmesser und danach mit einer Pasteurpipette mit halbem Durchmesser trituriert. Die Zellen wurden dann durch fünfminütiges Zentrifugieren bei 600 Upm geerntet und in 500 µl NMEM/B27 resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer, wurden die Zellen, je nach Bedarf auf den beschichteten Deckgläschen ($5 \times 10^3 - 2 \times 10^4$ Zellen) oder Zellkulturschalen (ca. 3×10^5 Zellen) ausgesät und in NMEM/B27 für 1 bis 4 Tage bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert. Aus beiden Hippocampi einer Maus konnten durchschnittlich ca. 3×10^5 Zellen gewonnen werden, aus beiden Cortices ca. $1-2 \times 10^6$ Zellen.

2.2.1.1.4 Elektroporation neuronaler Primärkulturen

Um Zellen zu elektroporieren wurden neuronale Kulturen, wie unter 2.2.1.1.3 beschrieben, hergestellt. Nach der Resuspension in NMEM/B27 wurden die Zellen für die Elektroporation erneut abzentrifugiert (600 Upm, 5 min, Raumtemperatur = RT). In der Zwischenzeit wurde die einzuschleusende DNA (Konzentration 3 µg) und die benötigte Menge an Elektroporationslösung auf RT gestellt. Der Überstand der abzentrifugierten Proben wurde dann komplett abgesaugt und die Zellen wurden in der Elektroporationslösung resuspendiert (200 µl bei doppeltem Elektroporationsansatz, 100 µl bei einfachem Elektroporationsansatz). 100 µl Zellsuspension wurden dann sofort mit der gewünschten DNA vermischt und in Elektroporationsküvetten überführt. Die Elektroporation fand im Elektroporator (Dr. L. Fischer, Heidelberg) bei 220V für 5 ms statt. Anschließend wurden die Zellen mittels Plastikpipetten in 400 µl vorgewärmtes NMEM/B27-Medium aufgenommen, auf beschichtete Deckgläschen ausgesät und bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert.

2.2.1.1.5 Adenovirale Transfektion neuronaler Primärkulturen

Hippocampale Zellen aus Wildtypmäusen und *Reeler* Mutanten wurden wie unter 2.2.1.1.3 beschrieben hergestellt und auf beschichteten Deckgläschen ausplattiert (5 x 10³ Zellen/Deckgläschen). Nach ca. 17 h Kultivationsdauer im Inkubator wurden die Zellen mit Adenoviren, die entweder SRF-VP16ΔMADS oder SRF-VP16 exprimierten, transfiziert (SRF-VP16ΔMADS 4,9 x 10⁷ PFU/ml; SRF-VP16 4,6 x 10⁷ PFU/ml). Nach weiteren 2 Tagen Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert und mit den gewünschten Antikörpern gefärbt (siehe 2.2.1.2). Die Effizienz der Virusinfektion betrug ca. 60-70% aller Zellen.

2.2.1.1.6 Stimulation neuronaler Primärkulturen mit Reelin und BDNF

Neuronale Zellen wurden, wie unter 2.2.1.1.3 beschrieben, hergestellt. Um das Neuritenwachstum nach Reelin Stimulation zu untersuchen, wurden hippocampale Zellen aus Wildtypmäusen und *Srf* Mutanten nach dem Ausplattieren (8 x 10³ Zellen/Deckgläschen) und Adhärenzen (ca. nach 3 h) mit Reelin-haltigen bzw. Kontroll-Überständen stimuliert. Die Überstände stammten aus stabil Reelin exprimierenden bzw. GFP-exprimierenden (Kontrolle) HEK293-Zellen, die vor der

jeweiligen Stimulation für 3 Tage in Opti-MEM kultiviert worden waren (siehe 2.2.1.4.4). Für die Stimulation wurde pro Deckgläschen 100 µl 10x aufkonzentrierter HEK293-Zell-Überstand auf 400 µl NMEM/B27-Zellmedium gegeben. Die Neurone wurden am nächsten Tag fixiert und gefärbt.

Um die Wirkung von Reelin auf eine veränderte Genexpression zu untersuchen, wurden corticale Zellkulturen (siehe 2.2.1.1.3) hergestellt (ca. 10^6 Zellen/35 mm Schale). Diese wurden nach drei Tagen Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ mit Reelin-haltigem bzw. mit Kontrollüberstand für verschieden lange Zeiten stimuliert (1,5 ml/35 mm Schale). Anschließend wurde aus den Zellen die RNA isoliert und cDNA für RT-PCR hergestellt (siehe 2.2.2.2 – 2.2.2.7). Als Positivkontrolle wurden zusätzlich Zellen mit BDNF (10 ng/ml) stimuliert.

2.2.1.2 Immuncytochemische Färbung

Neuronale Zellen wurden bis zum gewünschten Zeitpunkt auf beschichteten Deckgläschen in 4-well oder 24-well Zellkulturschalen mit NMEM/B27 im Inkubator kultiviert. Für die anschließende Färbung wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 15 min lang in 4% PFA/5% Sucrose/PBS fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Neurone 5 min mit 0,1% Triton-X-100/PBS permeabilisiert und das Detergenz anschließend durch zweimaliges Waschen entfernt. Nach 30 min Blockierung der Deckgläschen in 2% BSA/PBS wurde der Primärantikörper, der entsprechend in Blockierungslösung verdünnt worden war, hinzugegeben (300 µl/well). Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte für 1-2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Dann wurde nach mehrmaligem Waschen (3 - 4x) mit PBS, der in Blockierungslösung verdünnte fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper (300 µl/ well) hinzugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach drei Waschschritten mit PBS wurden die Zellen mit vorgewärmtem Moviol eingedeckelt.

Bei immuncytochemischen Färbungen, bei denen der Antikörper α-VP16 verwendet wurde, wurde ein leicht abgeändertes Färbeprotokoll angewandt. Bei diesem wurden die Zellen 15 min lang in 4% PFA/5% Sucrose/PBS fixiert und nach dreimaligem Waschen mit PBS für 10 min in 0,2% Triton-X-100/PBS permeabilisiert. Nach drei Waschschritten mit PBS wurde für 30 min mit 5% FCS/0,05% Tween/PBS blockiert, und der Primärantikörper in Blockierungslösung verdünnt für 1 h bei Raumtemperatur hinzugegeben. Nach dreimaligem 5-minütigen Waschen mit

PBS/0,05% Tween wurde der in Blockierungslösung verdünnte fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper (300 µl/ well) hinzugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem 5-minütigen Waschen mit PBS/0,05% Tween wurden die Zellen mit vorgewärmtem Moviol eingedeckelt.

2.2.1.3 Immunhistologische Färbung

Mäuse mit dem gewünschten Alter wurden mit CO₂ getötet und dekapitiert. Zum Teil wurden die Tiere auch mit einer letalen Dosis Chloralhydrat (800 mg/kg) intraperitoneal gespritzt und mit einer 4%iger Paraformaldehydlösung bei pH 7,4 transkardial perfundiert. Die Gehirne wurden freipräpariert und über Nacht in 4% PFA/PBS bei 4°C nachfixiert. Anschließend wurden die Hirne in 4% Agarose/PBS in 6-well Platten eingebettet. Das Schneiden der Hirne erfolgte mit Hilfe eines Vibratoms (Leica VT 1000S). Hierzu wurden die Mausgehirne in einem kleinen zugeschnittenem Agaroseblock mit Sekundenkleber auf den Objektisch des Vibratoms aufgeklebt. Die Dicke der Schnitte betrug zwischen 50 und 70 µm. Die Schnitte wurden mit einem Pinsel transferiert und in 4-, 6- oder 24-well Platten mit PBS gesammelt (ca. 3-4 Schnitte/well bei 4- und 24-well Platten, bis zu 12 Schnitten/well bei 6-well Platten). Die weiteren Färbe- und Waschschrte wurden unter leichtem Schütteln durchgeführt. Zuerst erfolgte ein 5-minütiger Waschschrte in PBST (PBS + 0,1%Tween). Die nachfolgenden Schritte unterschieden sich leicht voneinander in Abhängigkeit vom verwendeten Sekundärantikörper:

- **Färbeprotokoll bei fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper**

Die Schnitte wurden für 30 min in 5% NGS/PBST blockiert. Der Primärantikörper wurde in Blockierungslösung verdünnt und über Nacht bei 4°C hinzugegeben. Am nächsten Tag erfolgte ein 3x 15-minütiger Waschschrte mit PBST, bevor der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper 1:300 in Blockierungslösung verdünnt für 1 h bei RT im Dunkeln hinzugegeben wurde. Nach 3x 15-minütigem Waschen wurden die Schnitte 5 min in einer DAPI-Lösung gefärbt und mit PBS für 5 min gewaschen. Nun konnten die Schnitte auf Objektträger aufgezozen werden und nach Antrocknen im Dunkeln mit Moviol eingedeckelt werden.

- **Färbeprotokoll bei biotinyliertem Sekundärantikörper**

Um endogene Peroxidasen zu zerstören, wurden die Schnitte zunächst in einer 1% Wasserstoffperoxidlösung für 15 min inkubiert (49,5% PBS, 49,5% MeOH, 1% H₂O₂). Nach 3x 5-minütigem Waschen mit PBST und 30-minütigem Blockieren,

erfolgte die Inkubation des Primärantikörpers ebenfalls über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag erfolgte nach 3x 15-minütigem Waschen mit PBST die Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper 1:500 in Blockierungslösung verdünnt für 1 h bei RT. Anschließend wurde erneut gewaschen. Während diesem Waschschrift wurde eine ABC Kit Lösung angesetzt (Vectastain), die 30 min bei RT vorinkubiert wurde, bevor sie für 30 min den Schnitten zugesetzt wurde. Nach 3x 15-minütigem Waschen wurde die DAB-Substrat-Lösung hinzugegeben, die Signalentwicklung unter dem Mikroskop beobachtet und anschließend mit PBST abgestoppt. Die Schnitte wurden schließlich auf Objektträger aufgezogen, luftgetrocknet und mit Entellan unter dem Abzug eingedeckelt.

2.2.1.4 HEK293 Zellkultur

2.2.1.4.1 Kultivierung von GFP/Reelin exprimierenden HEK293 Zellen

Um Kontaminationen der HEK293 Zellen zu vermeiden, wurden alle Arbeitsschritte unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Dafür wurden alle Arbeiten unter einer sterilen Arbeitsbank getätigt und autoklavierte oder sterilfiltrierte keimfreie Nährmedien, Lösungen und Glaspipetten verwendet.

Nährmedien, 1x PBS und Trypsin wurden vor ihrer Verwendung im 37°C Wasserbad erwärmt. Die Zellen, wurden in 75 cm²-Schalen mit 10 ml Nährmedium gehalten, an deren Böden sie adhärten. Zur Selektion von Reelin bzw. GFP exprimierenden HEK293 Zellen wurde pro 10 ml Nährmedium 100 µl Selektionsantibiotikum G418 (50 mg/ml) zugefügt. Die Zelldichte wurde täglich unter dem Mikroskop kontrolliert. Jeden zweiten Tag wurden die Zellen gesplittet. Dazu wurde das alte Nährmedium abgenommen und die Zellen mit 10 ml 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit 2 ml Trypsin vom Boden abgelöst und in 10 ml Nährmedium aufgenommen. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:3 bzw. 1:10 geteilt und in einer neuen Zellkulturschale mit frischem Nährmedium (+ Selektionsantibiotikum) resuspendiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂.

2.2.1.4.2 Einfrieren von GFP/Reelin exprimierenden HEK293 Zellen (Kryokonservierung)

Zellen können in kleinen Zellsuspensionsmengen eingefroren und für längere Zeit in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden. Bei Bedarf können sie dann wieder aufgetaut und in Zellkultur genommen werden.

Um Zellen einzufrieren wurden diese mit 1x PBS gewaschen und mittels Trypsin (2 ml/Zellkulturflasche) vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden dann in jeweils 10 ml Nährmedium (ohne Antibiotikum) aufgenommen und in Falconröhrchen überführt. Nach 5-minütigem Zentrifugieren bei 1000 Upm wurde das Pellet in 2 ml 100% FCS (sterilfiltriert) resuspendiert und 5 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde jedem Falcon 2 ml Einfriermedium (Nährmedium ohne Antibiotikum + 20% DMSO) zupipettiert und die Zellen wurden wieder 5 min auf Eis gestellt. Die Zellsuspension wurde in 2 ml - Aliquots in Kryoröhrchen aufgeteilt. Zum schonenden Einfrieren der Zellen wurden diese zuerst für 2 h bei -20°C und dann über Nacht bei -80°C eingefroren. Die Langzeitlagerung erfolgte schließlich in flüssigem Stickstoff bei -196°C.

2.2.1.4.3 Auftauen von GFP/Reelin exprimierenden HEK293 Zellen

Bei Bedarf konnten Zellen aus dem Stickstofftank entnommen und durch schnelles Erwärmen im 37°C Wasserbad wieder aufgetaut werden. Durch die anschließend schnelle Aufnahme der Zellen in 5 ml vorgewärmtes Nährmedium (mit Penicillin 100 U/ml/Streptomycin 100 µg/ml, aber ohne Selektionsantibiotikum) wurde das bei höherer Temperatur zellschädigend wirkende DMSO rasch verdünnt. Nach 5-minütigem Abzentrifugieren bei 1000 Upm wurde das Zellpellet in frischem Nährmedium (ohne Selektionsantibiotikum) resuspendiert und die Zellen wurden in verschiedenen Verdünnungen (1:10, 1:3, 1:6) ausplattiert. Am nächsten Tag wurde das Zellkulturmedium durch frisches Medium + Selektionsantibiotikum ersetzt und die Zellen wieder in gewohnter Weise (siehe 2.2.1.4.1) kultiviert.

2.2.1.4.4 Gewinnung und Aufkonzentrierung Reelin-haltiger Überstände/Kontrollüberstände

Zur Herstellung Reelin-haltiger Überstände bzw. der Kontrollüberstände wurden die Zellen so lange kultiviert, bis sie möglichst dicht waren (mind. 80% konfluent). Dann wurde das Nährmedium abgenommen. Die Zellen wurden mit 10 ml 1x PBS gewaschen und für 2-4 Tage in Opti-Mem (10 ml/75 cm² Zellkulturschale) kultiviert.

Selektionsantibiotikum wurde nur zugeführt, wenn die Zellen für 3 Tage oder länger in Opti-Mem kultiviert wurden.

Nach einer dreitägigen Produktionsphase wurde der Überstand abgenommen und durch 8-minütiges Zentrifugieren bei 1000 Upm von toten Zellen und Zellresten befreit. Der aufgereinigte Überstand konnte dann nach Belieben durch Zentrifugation mit Hilfe eines Amicon-Zentrifugenröhrchens zusätzlich 10x aufkonzentriert werden. Der Überstand wurde anschließend sofort in den jeweiligen Experimenten verwendet. Mit der Herstellung der Kontrollüberstände aus den GFP exprimierenden HEK293 Zellen wurde in derselben Weise verfahren. Dabei wurde außerdem darauf geachtet, dass sich die Kontrollzellen in derselben Passage wie die Reelinzellen befanden und die Zelldichte mit der, der Reelin exprimierenden Zellen vergleichbar war.

Die Produktion von Reelin im Überstand wurde durch Abnahme eines kleinen Aliquots im Western Blot mit dem *mouse* α -Reelin G10 Antikörper (1:1000, Chemicon) überprüft.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Genotypisierung der Mäuse

2.2.2.1.1 Lyse der Schwanzbiopsie

Für die Bestimmung des Genotyps der verwendeten Mäuse wurde bei jeder präparierten Maus ein ca. 0,5 cm langes Stück vom Schwanz abgeschnitten und einem ProteinaseK Verdau unterzogen. Hierfür wurden die Schwanzspitzen in 500 μ l Lysepuffer aufgenommen. Die Proben wurden über Nacht bei 55°C unter Schütteln im Thermoblock inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Lysat 10 sec gevortext und nicht lysiertes Gewebe durch dreiminütiges Zentrifugieren bei 13.000 Upm (Raumtemperatur) pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bis zur Genotypisierung mittels PCR bei 4°C aufbewahrt.

2.2.2.1.2 PCR zur Bestimmung des Srf Genotyps

Für alle nachfolgenden PCR-Genotypisierungen dienten die in 2.2.2.1.1 gewonnenen ProteinaseK verdauten Schwanzlysate als Matrize. Die jeweils pipettierten Ansätze

wurden mit einigen Tropfen Mineralöl überschichtet, gevortext und abzentrifugiert. Bei allen PCR-Ansätzen handelte es sich um ein *Hot Start* Protokoll, bei dem das Enzym erst während dem 80,0°C Schritt dazugegeben wurde.

Tabelle 2.1 PCR zur Bestimmung des *Srf* Genotyps

Reagenzien	µl / Ansatz	PCR-Programm
Wasser	3,6	97,5°C 10min
10x PCR Puffer	5	80,0°C 10min
DMSO	2,5	94,0°C 2min
dNTP's (10mM)	1,0	94,0°C 30sec
Primer AW (10µM)	1,5	65,0°C 30sec 35x
Primer BW (10µM)	1,5	72,0°C 30sec
Primer CW (10µM)	0,5	72,0°C 7min
Genomische DNA	1,5	4,0°C ∞
redHot Taq-Polymerase (5U)	0,5	
Gesamtvolumen pro Ansatz	50	

Bei *Srf* Mutanten wurde eine Bande bei 530 bp erwartet, bei reinen Wildtypmäusen eine Bande bei 600 bp und bei heterozygoten Tieren Banden bei 530 und 600 bp.

2.2.2.1.3 PCR zur Bestimmung des *CamKIIαCre* Genotyps

Tabelle 2.2 PCR zur Bestimmung des *CamKIIαCre* Genotyps

Reagenzien	µl / Ansatz	PCR-Programm
Wasser	37,5	97,5°C 10min
10x PCR Puffer	5	80,0°C 10min
dNTP's (10mM)	1,2	94,0°C 2min
Primer CreS (10µM)	1,2	94,0°C 30sec
Primer CreAS (10µM)	1,2	65,0°C 30sec 35x
Primer PCR3 (10µM)	1,2	72,0°C 30sec
Primer PCR4 (10µM)	1,2	72,0°C 7min
Genomische DNA	1	4,0°C ∞
redHot Taq-Polymerase (5U)	0,5	
Gesamtvolumen pro Ansatz	50	

Bei nicht *CamKIIα-iCre* transgenen Mäusen wurde nur eine interne PCR-Kontrollbande bei 500 bp erwartet, bei transgenen Mäusen zusätzlich eine Bande bei 300 bp.

2.2.2.1.4 PCR zur Bestimmung des *Reelin* Genotyps

Tabelle 2.3 PCR zur Bestimmung des *Reelin* Genotyps

Reagenzien	μl / Ansatz	PCR-Programm
Wasser	35,5	97,5°C 10min
10x PCR Puffer	5	80,0°C 2min
dNTP's (10mM)	1	94,0°C 1min
Primer Reln rev-wt (10 μM)	3	94,0°C 30sec
Primer Reln rev-rl (10 μM)	2	50,0°C 30sec 35x
Primer Reln fw-wt (10 μM)	2	72,0°C 30sec
Genomische DN A	1	72,0°C 10min
redHot Taq-Polymerase (5 U)	0,5	4,0°C ∞
Gesamtvolumen pro Ansatz	50	

Bei *Reeler* Mutanten wurde eine Bande bei 363 bp erwartet, bei reinen Wildtypmäusen eine Bande bei 266 bp und bei heterozygoten Tieren Banden bei 266 und 363 bp. Reine Wildtypmäuse und heterozygote Tiere wurden gleichermaßen als Kontrolltiere für die Experimente eingesetzt.

2.2.2.1.5 PCR zur Bestimmung des *Thy1-GFP* Genotyps

Tabelle 2.4 PCR zur Bestimmung des *Thy1-GFP* Genotyps

Reagenzien	μl / Ansatz	PCR-Programm
Wasser	38,5	97,5°C 10min
10x PCR Puffer	5	80,0°C 2min
dNTP's (10mM)	1	94,0°C 2min
Primer GFP fw (10 μM)	1	94,0°C 30sec
Primer GFP rev (10 μM)	1	55,0°C 30sec 30x
Primer IL-2 fw (10 μM)	1	72,0°C 30sec
Primer IL-2 rev (10 μM)	1	72,0°C 7min
Genomische DNA	1	4,0°C ∞
redHot Taq-Polymerase (5 U)	0,5	
Gesamtvolumen pro Ansatz	50	

Für *Thy1-GFP* positive Tiere wurde eine Bande bei 180 bp erwartet. Als interne Positivkontrolle für die PCR wurde eine Bande bei 350 bp erwartet.

2.2.2.1.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der PCR-Produkte entsprechend ihrer Größe erfolgte bei einer angelegten Spannung von 10 V pro cm Gellänge in einem 2%igem Agarosegel. Zur Sichtbarmachung der DNA unter UV-Licht wurde dem Gel bei der Herstellung Ethidiumbromid (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugesetzt. 1x TAE-Puffer diente als Laufpuffer der Elektrophorese. Als Längenstandard wurde eine 100 bp DNA-Leiter von Genaxxon eingesetzt.

2.2.2.2 RNA-Isolation aus neuronaler Zellkultur (*RNeasy[®] mini kit, QIAGEN*)

Die Isolation von RNA wurde mit dem *RNeasy[®] mini kit* der Firma Qiagen durchgeführt. Alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur und wurden zügig durchgeführt. Zur Gewinnung von RNA aus kultivierten neuronalen Zellen wurde nach zwei- bis dreitägiger Inkubation der Zellen bei 37°C, 5% CO₂ das Medium aus den Zellkulturschalen entfernt, die Zellen mit 350 µl RLT + β-Mercaptoethanol lysiert und das Zelllysate mit Hilfe eines Zellschabers abgekratzt und in ein Eppendorfgefäß transferiert. Nach kurzem Vortexen, folgte durch zweiminütiges Zentrifugieren mit Hilfe der *QIAshredder spin* Säule die Homogenisierung des Lysates. Das homogenisierte Lysat wurde mit 350 µl 70% Ethanol gemischt, in eine *RNeasy mini* Säule übertragen und 15 sec bei 10.000 Upm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 700 µl RW1 Puffer versetzt und für 15 sec bei 10.000 Upm zentrifugiert. Es folgten zwei erneute Waschschrte mit jeweils 500 µl RPE Waschpuffer + EtOH, wobei die Säule im 2. Durchgang durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 10.000 Upm getrocknet wurde. Nach Belieben konnte die Säule durch einen zusätzlichen Zentrifugationsschritt bei 13.000 Upm für 1 min getrocknet werden. Zuletzt wurde die RNA in zwei aufeinanderfolgenden Zentrifugationsschritten (1 min, 10.000 Upm) in einem Gesamtvolumen von 50 µl RNase freiem Wasser eluiert. Die gewonnene RNA wurde bei -20°C eingefroren.

2.2.2.3 RNA-Isolierung aus neuronalem Gewebe (*RNeasy[®] mini kit, QIAGEN*)

Gewebe wie z.B. freipräparierte Hippocampi wurden möglichst ohne Flüssigkeit in ein Eppendorfgefäß transferiert und bis zur RNA-Isolierung in flüssigem Stickstoff zwischengelagert und anschließend mit 350 µl RLT Puffer + β-Mercaptoethanol versetzt. Das Gewebe wurde mit einer Injektionsnadel (20G x 1½") lysiert und Zelltrümmer wurden durch dreiminütiges Zentrifugieren bei 13.000 Upm pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 350 µl 70% EtOH vermischt und in eine *RNeasy mini* Säule aufgetragen. Die nachfolgenden Wasch- und Eluierungsschritte entsprechen dem Protokoll der RNA-Isolierung aus neuronaler Zellkultur (siehe unter 2.2.2.2).

2.2.2.4 DNaseI-Verdau

Um mögliche verbliebene DNA aus dem unter 2.2.2.2 oder 2.2.2.3 gewonnenen RNA-Eluat zu entfernen wurde nach jeder RNA-Isolation ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierfür wurde 50 µl RNA-Eluat zusammen mit 5 µl 10x DNaseI Puffer und 1 µl DNaseI zuerst für 30 min bei 37°C, dann für 20 min bei 65°C inkubiert (zur Inaktivierung der DNase) und anschließend sofort auf Eis gestellt.

2.2.2.5 Bestimmung der RNA-Konzentration

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde die RNA 1:25 in H₂O verdünnt. Die anschließende Messung der RNA-Konzentration erfolgte im Photometer (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech).

Es wurden Extinktionswerte gegen den Leerwert (Wasser) bei 260, 280 und 320 nm gemessen. Bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht eine Extinktion von 1 einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Bei 280 nm wird der Proteingehalt gemessen. Die Absorption bei 320 nm ist ein Zeichen für Kontaminationen, daher wird der bei 320 nm ermittelte Extinktionswert von den beiden anderen Messwerten abgezogen. Der Quotient aus den Extinktionen von 260 nm und 280 nm gibt die Reinheit der RNA-Proben an und sollte nicht unter 2.0 liegen. Aus ca. 4×10^5 Zellen konnte durchschnittlich 2 µg RNA, aus den beiden komplett isolierten Hippocampi einer P16 Maus konnte ca. 15 µg RNA isoliert werden.

2.2.2.6 cDNA-Synthese

Durch Reverse Transkription wurde die eluierte RNA in stabilere cDNA umgeschrieben. Als Primer für die Reverse Transkriptase wurden *Random Hexamers* eingesetzt. Dies sind kurze Oligonukleotide, die mit unterschiedlichen, zufälligen Basenabfolgen an Nukleinsäure-Moleküle binden und somit als Startsequenzen für die Reverse Transkriptase dienen können.

Für die Reverse Transkription wurde zunächst 1 µg RNA mit RNase freiem H₂O auf einen 20 µl Ansatz gebracht und 5 µl Random Hexamers (0,1 nmol/µl) wurden zupipettiert. Der Mix wurde für 10 min bei 70°C inkubiert und danach auf Eis gestellt. Anschließend wurde folgender Reaktionsmix hinzugefügt:

7 µl 5x M-MLV-RT Puffer, 2 µl dNTPs (10 mM), 0,5 µl RNase Inhibitor und 0,5 µl Reverse Transkriptase.

Die Ansätze wurden für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann für 45 min bei 42°C. Die Reverse-Transkriptase wurde schließlich durch dreiminütige Inkubation bei 99°C inaktiviert und die Proben auf Eis gestellt. Abschließend wurde den Ansätzen noch jeweils 15 µl RNase freies Wasser hinzugefügt. Alle Proben wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Die negativen Kontrollansätze wurden nach demselben Schema hergestellt, enthielten aber keine Reverse Transkriptase. Dadurch konnte später bei der RT-PCR überprüft werden, ob Kontaminationen durch genomische DNA auszuschließen waren.

2.2.2.7 Semiquantitative Real Time - PCR (RT-PCR)

Die semiquantitative RT-PCR ist eine Methode, mit der die relativen mRNA-Mengen von Genen analysiert werden können. Nach RNA-Isolierung und cDNA-Synthese erfolgt eine PCR. Quantifizierung des PCR-Produktes mit spezifischen Primern gibt über die Transkriptionsrate eines Genes Auskunft, da die Menge an PCR-Produkt mit der Ausgangsmenge an mRNA korreliert.

In dieser Arbeit wurde diese Methode mit Hilfe der SYBR green PCR Technologie von Perkin Elmer durchgeführt. SYBR green ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich in doppelsträngige DNA einlagert. Fluoreszenzmessung nach jedem PCR-Zyklus mit dem *ABI PRISM 7000 Sequence Detection System* (Applied Biosystems) gibt somit Aufschluss über die aktuelle PCR-Produktmenge. Für die Auswertung wurde der sog. Ct-Wert (*cycle threshold*) bestimmt. Dieser Wert gibt an, wieviele Zyklen man für den jeweiligen PCR-Ansatz braucht, bis das Fluoreszenzsignal einen definierten Schwellenwert überschreitet. Je höher dieser Wert, desto niedriger war die Template-Menge. Um eine ungenaue RNA-Messung bzw. ungleiche cDNA-Mengen im Startansatz auszugleichen, wurden gleichzeitig die Ct-Werte einer endogenen Kontrolle bestimmt, hier wurde zur Normalisierung das *housekeeping gene* GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) als interner Standard verwendet. Die relative RNA-Menge berechnet sich anschließend aus der Formel:

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

Die PCR-Ansätze wurden als Duplett in 96-Loch-Mikrotiterplatten pipettiert, die Platten mit Folie versiegelt und die RT-PCR gestartet.

Tabelle 2.5 Pipettieransatz für die RT-PCR

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

Tabelle 2.6 PCR-Programm

Temperatur	Zeit	Zyklen
50 °C	2 min	1
95 °C	10 min	
95 °C	15 sec	40
60 °C	1 min	
95 °C	15 sec	1
60 °C	20 sec	
95 °C	15 sec	

2.2.2.8 Genexpressionsanalysen mittels *Affymetrix GeneChip® Arrays*

Mit Hilfe von *Affymetrix GeneChip® Arrays* konnte die Expression von Genen zwischen Wildtypmäusen und *Srf* Mutanten genomweit verglichen werden.

2.2.2.8.1 Eigenschaften der verwendeten *GeneChips®*

Für die Analyse der differentiellen Genexpression im Hippocampus von Wildtypmäusen und *Srf* Mutanten wurden die *GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Arrays* der Firma Affymetrix verwendet. Diese beinhalten 45.000 *probe sets*, die die Expression von mehr als 39.000 Transkripten von über 34.000 Genen der Maus analysieren. Ein Transkript wird durch elf verschiedene Oligonukleotidpaare (sog. *probe set*) detektiert. Die *in situ* aufgetragenen Oligonukleotide besitzen eine Länge von 25 bp. Die verschiedenen Probenpaare des *probe sets* sind über den gesamten Chip verteilt, so dass z.B. nach einer mechanischen Schädigung eines Teilbereichs der Hybridisierungsfläche (z.B. durch Kratzer) die Information eines Probensets nicht vollständig verloren geht. Ein Probenpaar besteht jeweils aus einer *perfect match* (PM) und einer *mismatch* Probe (MM). Im Gegensatz zur PM-Probe, die genau komplementär zur Sequenz ist, enthält die MM-Probe eine Basensubstitution in der

Mitte des Oligonukleotids. Die MM-Probe dient der Bestimmung der Hintergrundintensität. Bei der Berechnung des Gesamtsignals eines Probenpaares wird die Hybridisierungsintensität der MM-Probe daher vom PM-Wert subtrahiert, um einen absolut spezifischen Signalwert zu erhalten.

2.2.2.8.2 Probenaufarbeitung

Für die Genexpressionsanalysen wurden aus zwei Wildtypmäusen und aus zwei *Srf* Mutanten die RNA aus hippocampalem Gewebe mit Hilfe des *RNeasy[®] mini kits* der Firma Qiagen isoliert. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt. 25 µl der isolierten RNA wurden für die Affymetrix Chips bereitgestellt, die restlichen 25 µl der isolierten RNA wurden für RT-PCR verwendet.

2.2.2.8.3 Affymetrix GeneChip Protokoll

Alle weiteren Arbeitsschritte wurden am MPI Tübingen unter Anleitung von Markus Schmid durchgeführt. Detaillierte Informationen des Protokolls sind auch unter http://www.weigelworld.org/resources/microarray/AtGenExpress/AtGE_probe_synthesis.pdf erhältlich. Im nachfolgenden sind die wichtigsten Arbeitsschritte zusammengefasst:

Die ersten Arbeitsschritte dienten dazu, die RNA durch Reverse Transkription in einzelsträngige cDNA umzuschreiben, um schließlich daraus doppelsträngige cDNA zu synthetisieren. Alle benötigten Reagenzien und Puffer für die Herstellung und Aufreinigung von cDNA und später von biotinylierter cRNA stammten aus dem "*MessageAmpTM II-Biotin Enhanced, Single Round aRNA Amplification Kit*" von Ambion. Für die Herstellung von cDNA wurde nur 1 µg RNA als Startmaterial benötigt. Die doppelsträngige cDNA wurde dann nach Anleitung des Kits aufgereinigt und konnte nach Belieben bei -80°C aufbewahrt werden. Durch *in vitro*-Transkription bei 37°C für 16 h erfolgte die Herstellung von Biotin-markierten cRNA, die ebenfalls aufgereinigt wurde. Anschließend wurde die Konzentration der cRNA bestimmt. 15 µg cRNA wurden für die Hybridisierung fragmentiert. Bevor die cRNA für die Hybridisierung eingesetzt wurde, wurde die Qualität der synthetisierten cRNA und die Fragmentierung der RNA im Agarosegel überprüft. War die Qualität und Fragmentierung der RNA zufriedenstellend, wurden 15 µg der Biotin-markierten fragmentierten cRNA in einem Hybridisierungspuffer aufgenommen und für 16 h bei

45°C unter Rotation auf den Affymetrix *Microarrays* hybridisiert. Nach der Hybridisierung erfolgte die Färbung der gebundenen biotinylierten cRNA mit einer Streptavidin-Phycoerythrin-Lösung und das Waschen der Affymetrix *Microarrays* in der *GeneChip® Fluidics Station 450*. Die gefärbten *Microarrays* konnten anschließend mit dem *GeneChip® Scanner 3000* bei 570 nm ausgelesen und die erhaltenen Rohdaten weiter analysiert werden.

Abb. 2.1 zeigt zusammenfassend das Prinzip der Affymetrix *GeneChip®* Technologie

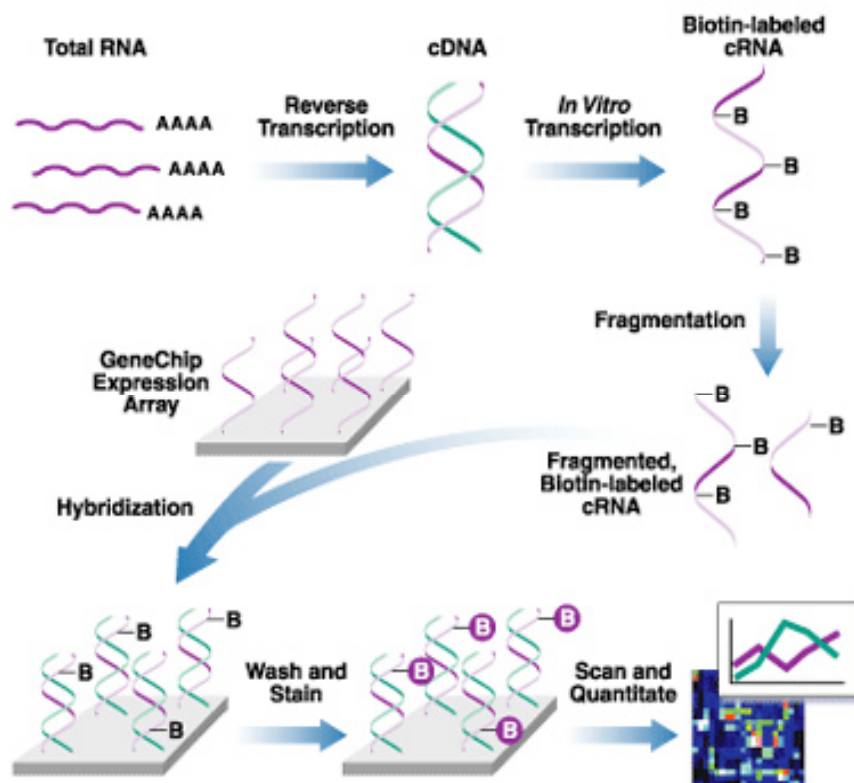


Abb. 2.1 Genomweite Analyse der Genexpression mit Hilfe von GeneChips

Biotin-markierte cRNA wird durch *in vitro*-Transkription von cDNAs der isolierten RNA synthetisiert und aufgereinigt. Die fragmentierte cRNA wird dann auf dem *Microarray-Chip* hybridisiert. Die durch computergestützte Analysen erhaltenen Rohdaten werden normalisiert und weiter analysiert (www.Affymetrix.com).

2.2.2.8.4 Statistische Auswertung der Expressionsdaten

Für die Analyse der Daten wurde das Paket von statistischen Funktionen der Programmiersprache "R", das im Bioconductor Projekt (<http://www.bioconductor.org>) integriert ist, verwendet. Um die Daten der verschiedenen *GeneChips* miteinander vergleichen zu können, wurden diese zuerst nach dem gcRMA-Algorithmus normalisiert. Differenziell exprimierte Gene wurden durch "Rank Product", welches

ebenfalls in "R" implementiert ist, identifiziert. Letztendlich wurden nur *probe sets* weiter analysiert, die eine Falsch Positiv Rate von $p_{fp} \leq 0.05$ besaßen.

Die Daten wurden letztendlich in *GeneSpring 7.1* (Agilent Technologies) importiert und konnten weiter analysiert und graphisch dargestellt werden.

Es wurden nur Gene weiter analysiert, die zwischen *Srf* Mutanten und Kontrolltieren um mindestens den Faktor 2 verändert waren.

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Herstellung von Proteinextrakten aus hippocampalem Gewebe

Die Hippocampi einer Maus wurden freipräpariert und bis zur vollständigen Beendigung der Präparation in kaltem PBS für kurze Zeit auf Eis zwischengelagert. Das Gewebe wurde anschließend in 500 µl Lysepuffer mit einer Injektionsnadel (20G x 1½") aufgelöst. Um die Zellen zu lysieren, wurden diese nach kurzem Vortexen für 30 min bei 4°C in einem Rotator über Kopf geschüttelt. Die Zellproteine konnte man anschließend durch eine zweiminütige Zentrifugation bei 13.000 Upm bei 4°C im Überstand gewinnen. Der Proteinextrakt wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und nach erfolgter Bradford-Messung (siehe 2.2.3.2) mit 6x Ladepuffer versetzt, welcher hierbei 1:6 verdünnt wurde. Die Proben wurden zur Denaturierung der Proteine für 5 min bei 95°C inkubiert und zur Aufbewahrung bei -20°C eingefroren.

2.2.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Extinktionsmessung wurden 795 µl H₂O mit 5 µl Probe (bzw. für die Referenz mit 5 µl Lysepuffer) und mit 200 µl Bradford-Reagenz gemischt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, und die Extinktion bei 595 nm im Photometer ermittelt. Die spätere Konzentrationszuordnung der einzelnen Proben erfolgte über eine Eichgerade, die aus bekannten BSA-Konzentrationen (*bovine albumine serum*) ermittelt wurde.

2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der isolierten Proteine erfolgte in einem diskontinuierlichem SDS-Polyacrylamidgel, in welchem die Proteine zuerst bei 50 V ein 4% Sammelgel

durchliefen, welches zur Konzentrierung der Proben diente, und anschließend bei 150 V in einem 10% Trenngel aufgetrennt wurden. Es wurden Proteinmengen im Bereich von 15-30 µg aufgetragen. Neben den mit Ladepuffer versetzten Proteinlysaten wurde zusätzlich der *prestained protein ladder* als Größenmarker aufgetragen.

2.2.3.4 Western Blot

Beim Western Blot wurden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine durch Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran übertragen und anschließend durch spezifische Antikörper auf der Oberfläche der Membran detektiert. Für dieses Verfahren wurde die *Blotting*-Apparatur von Bio-Rad verwendet (*Mini Tran Blot[®] Electrophoretic Transfer Cell*, Biorad).

Zur Vorbereitung des Transfers wurde die hierfür benötigte PVDF-Membran in Methanol getränkt und anschließend wie das Whatmanpapier und die Schwämme in 1x Transferpuffer feucht gehalten. Die Gele wurden nach der SDS-PAGE ebenfalls in 1x Transferpuffer gewaschen. Der Aufbau für den Elektrotransfer erfolgte blasenfrei nach dem „*Sandwich*-Prinzip“ (von Minus- zu Plus-Pol): Schwamm, Whatman-Papier, Gel, Membran, Whatmanpapier, Schwamm. Der Transfer fand bei 150 V unter Kühlung mit Hilfe eines Eisblocks innerhalb einer Stunde statt. Der Transfer der Proteine auf die Membran konnte mittels Ponceau S-Färbung überprüft werden.

Nach dem Transfer wurden die noch freien Bindungsstellen auf der Membran mit 5%igem Magermilch-Blockierungspuffer abgesättigt. Die Blockierungszeit betrug 30 min. Nach 15-minütigem Waschen der Membran in TBST wurde der in Blockierungspuffer verdünnte Primärantikörper über Nacht bei 4°C auf die Membran gegeben. Nach einigen Waschschritten (3 x 15 min in TBST) zum Entfernen von ungebundenen Antikörpern erfolgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem Sekundärantikörper. Zuletzt wurden nach mehreren Waschschritten die Membranen eine Minute lang mit der ECL-Entwicklungs-Lösung benetzt. Die am zweiten Antikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase oxidiert das Luminol des ECL. Das durch die Oxidation angeregte Luminol fällt anschließend unter Lichtemission in den Grundzustand zurück. Das ausgesandte Licht wurde in der Dunkelkammer mittels Filmauflage registriert.

2.2.3.5 Quantifizierung von Banden im Western Blot

Mit Hilfe des *Personal Densitometer SI* von Molecular Dynamics und der *ImageQuant Software* wurden die Gelbilder eingescannt und die relative Dichte der einzelnen Banden ermittelt. GAPDH diente als Ladekontrolle und wurde in die Auswertung als interner Standard miteinbezogen. Durch dieses Verfahren konnten die relativen Proteinmengen bestimmter Gene zwischen Wildtypmäusen und *Srf* Mutanten verglichen werden.

2.2.3.6 Rho Pulldown Assay

Im Pulldown Assay lassen sich die kleinen Rho-GTPasen im aktivierten, GTP-gebundenen Zustand nachweisen. Im Rho Pulldown Assay wird die Eigenschaft ausgenutzt, dass aktives Rho mit hoher Affinität an die Rho-Bindedomäne von Rhotekin bindet. Rhotekin ist ein Effektor von Rho.

Im Rho Pulldown Assay wird daher ein C21-GST-Fusionsprotein verwendet, das die Rho-Bindedomäne von Rhotekin enthält (GST = Glutathion-S-Transferase). Diese Fusionsproteine werden anschließend an Glutathion-Sepharose-Beads gekoppelt und mit dem zu untersuchenden Zelllysat (in unserem Fall mit P14 Cortextgewebelysaten von Wildtypmäusen und *Srf* Mutanten) versetzt. Aktives Rho kann somit aus dem Zelllysat herausgefischt werden. Anschließend kann im Western Blot die Menge an aktivem Rho im Verhältnis zur Rho-Gesamtmenge analysiert werden.

2.2.3.6.1 Herstellung von Sepharose-gekoppelten C21-GST-Fusionsproteinen

Bakterienzellen (kompetente Top10 F), die das C21-GST-Protein exprimieren, wurden freundlicherweise von T. Skutella, Anatomisches Institut, Uni Tübingen zur Verfügung gestellt. Das C21-GST-Plasmid stammte ursprünglich von I. Just, MHH Hannover (Reid et al., 1996). 50 µl der erhaltenen Bakterienzellen wurden in 50 ml LB-Medium + Ampicillin (50 µg/ml) als Übernachtskultur bei 37°C unter Schütteln angesetzt. Am nächsten Tag wurde die Übernachtskultur 1:100 in 200 ml LB-Amp-Medium verdünnt und für ca. 1 h bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 herangezogen. Die Proteinsynthese wurde dann mit 0,1 mM IPTG für 2-3 h im Schüttelinkubator induziert. 100 ml der Bakterienkultur wurden bei 4°C, 4000 Upm für 15 min abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml *Bacterial Lysis Puffer* +

Proteaseinhibitor (PI) auf Eis resuspendiert und mit Ultraschall lysiert (Branson Sonifier 250: 2 min, *Output 5*, *Duty cycle 50*). Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation in Glaszentrifugenröhrchen (genau austarieren !) für 20 min bei 10.000 Upm, 4°C, pelletiert. Die Überstände wurden anschließend zu 1 ml 50% Glutathion-Sepharose-Slurry (Amersham) gegeben und bei 4°C unter Rotation für 2 h inkubiert. Die Glutathion-Sepharose-Beads wurden für 5 min bei 500 g, 4°C, abzentrifugiert und zweimal mit *Lysis Puffer* (ohne PI) gewaschen. Anschließend wurden die Glutathion-Sepharose-Beads in 1 ml *GST-Fish Puffer* + Proteaseinhibitor resuspendiert.

2.2.3.6.2 Herstellung der Gewebelysate

Für den Rho Pulldown Assay wurden von Wildtypmäusen und *Srf* Mutanten Cortexgewebelysate hergestellt. Hierfür wurde der Cortex von P14-Mäusen in kaltem PBS herauspräpariert und in 1 ml modifiziertem RIPA-Puffer im Homogenisator (Polytron® PT-ML 2100, Stufe 19) lysiert. Nach Zentrifugation bei 14.000 Upm für 15 min bei 4°C konnte der Überstand für den eigentlichen Pulldown Assay verwendet werden. Ein Aliquot des Überstandes wurde außerdem für die Bradfordmessung, ein weiteres Aliquot für die Bestimmung der Gesamt-Rho-Menge im Western Blot verwendet.

2.2.3.6.3 Pulldown Assay

Alle Schritte fanden bei 4°C und auf Eis statt. 500 µl Gewebelysate wurde mit 150 µl Glutathion-Sepharose-gekoppelten C21-GST-Fusionsproteinen vermischt und bei 4°C für 2 h unter Rotation inkubiert. Anschließend wurden die Glutathion-Sepharose-Beads durch Zentrifugation bei 500 g für 5 min vom Überstand befreit und dreimal mit je 500 µl *GST-Fish Puffer* + Proteaseinhibitor gewaschen. Die beads wurden in 60 µl 2,6x sample buffer resuspendiert und bei -20°C weggefroren.

2.2.3.6.4 Detektion der aktiven Rho-GTP-Menge im Western Blot

Die eingefrorenen Proben wurden bei 100°C für 2 min aufgeköcht, die Ablösung der Fusionsproteine von den beads wurde zusätzlich durch die Zugabe von 2 µl 1M DTT-Lösung unterstützt. Die Proben wurden kurz abzentrifugiert und der Überstand für

SDS-Page und Western Blot verwendet. Für die Detektion von Rho-GTP wurde der anti-Rho-Antikörper von Upstate verwendet. Zusätzlich im Gel wurde das aus dem Gesamtlysat gewonnene Aliquot aufgetragen, so dass auch die Gesamtmenge von Rho bestimmt werden konnte.

2.2.3.6.5 Herstellung von Glycerolstocks

Aus der Bakterienübernachtskultur konnten 5 ml für die Herstellung von Glycerolstocks abgenommen werden. Diese wurden bei 4000 Upm für 10 min abzentrifugiert und das Bakterienpellet wurde in 1 ml LB-Medium-Glycerol-Gemisch (1:2) aufgenommen und bei -80°C weggefroren.

2.2.4 Statistik und Auswertung von Bildern

Für alle Experimente wurden mindestens 3 Versuchstiere/Genotyp analysiert (Ausnahme *GeneChip Arrays*: hier Dupletts/Genotyp). Statistische Signifikanzen wurden durch den t-test ermittelt mit *, **, *** für $P \leq 0.05$, 0.01, 0.001. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

Für die Aufnahmen von mikroskopischen Bildern wurde das Mikroskop Axiovert 200M von Zeiss verwendet (Ausnahme: *spine* Aufnahmen mit konfokalem LSM, Zeiss). Für die Bild-Auswertungen wurden als Software *Axiovision* (Zeiss) oder *Slidebook* (Intelligent Imaging Innovations, Göttingen) benutzt. Die Bilder wurden in *Photoshop* nachbearbeitet und in *Freehand* graphisch dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse zum Manuskript 1

In Neuronen wurde SRF bisher als Transkriptionsfaktor beschrieben, der neuronale Migration (Alberti et al., 2005), axonale Wegfindung (Knoll et al., 2006; Wickramasinghe et al., 2008) und synaptische Funktionen reguliert (Etkin et al., 2006; Ramanan et al., 2005). Um neue SRF-Zielgene und dadurch neue Funktionen von SRF im Gehirn der Maus zu entdecken, wurde mit Hilfe der *GeneChip*-Technologie auf genomweiter Ebene die Genexpression im Gehirn von Wildtyp- und vorderhirnspezifischen konditionalen *Srf knock-out* Mäusen (**siehe Einleitung Abb. 1.8**) (Alberti et al., 2005) verglichen.

3.1.1 SRF als Regulator der Oligodendrocytendifferenzierung

Für einen genomweiten Vergleich der Genexpression wurde als Startmaterial für die *GeneChips* RNA aus den Hippocampi von P14 Mäusen isoliert. Die Auswertung der *GeneChips* ergab, dass in den *Srf* Mutanten im Vergleich zu den Kontrolltieren von insgesamt 39.000 Genen 44 Gene signifikant und mindestens 2-fach herunterreguliert waren (**Abb. 1; Ergänzungstabelle 1**). Auffälligerweise standen ca. die Hälfte dieser schwächer exprimierten Gene im Zusammenhang mit der axonalen Myelinisierung bzw. mit der Oligodendrocytendifferenzierung. Die herunterregulierten Gene codierten entweder direkt für Strukturproteine des Myelins (wie z.B. *Pip1*, *Mbp*, *Mag*) oder waren mit bekannten Oligodendrocytenfunktionen annotiert (z.B. *Ugt8a*, *Cldn11*, *Hes5*). Für einige der Gene (wie *Tmem10*) sind die Funktionen bis jetzt unbekannt, doch werden auch diese Gene spezifisch in Oligodendrocyten exprimiert (Cahoy et al., 2008). Ein Großteil der *GeneChip*-Daten wurde mittels RT-PCR und Western Blot validiert (**Ergänz. Abb. 1**). Zusammenfassend ließen die Daten darauf schließen, dass im Wildtyp SRF die Oligodendrocytendifferenzierung und die Myelinisierung positiv beeinflusst. Eine solche stimulierende SRF-Funktion auf die

Oligodendrocytendifferenzierung bzw. Myelinisierung wurde durch anschließende histologische Untersuchungen in den Gehirnen der Mäuse bestätigt. Immunhistochemische Färbungen von Gehirnschnitten wiesen in den *Srf* Mutanten eine stark reduzierte Myelinisierung der Axone im Corpus Callosum, Cortex und Striatum auf (**Abb. 2a-d**). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass v.a. Axone mit größerem Durchmesser überhaupt nicht myelinisiert waren (**Abb. 3**).

Eine Reduktion der Myelinisierung kann prinzipiell durch fehlende oder komplett degenerierte Axone entstehen. Weiterfolgende immunhistochemische Untersuchungen ergaben, dass die beobachtete Reduktion der Myelinisierung nicht auf indirekte Art und Weise durch den Verlust von Axonen verursacht wurde, da der Durchmesser von Corpus Callosum und der hippocampalen Kommissur zwischen Wildtypmäusen und *Srf* Mutanten keinen signifikanten Größenunterschied aufwies (**Abb. 2g, h; Ergänz. Abb. 5a-c**). Allerdings konnte festgestellt werden, dass Marker, wie z.B. APP (*amyloid precursor protein*), die mit axonaler Degeneration assoziiert sind (Lappe-Siefke et al., 2003), in den Mutanten vermehrt vorkamen (**Abb. 2i, j; Ergänz. Abb. 5d-k**). Weitere histologische Analysen ergaben, dass Astrocytenmarker, wie z.B. GFAP, in den *Srf* Mutanten stärker exprimiert wurden, was auf eine Astrogliose hindeutete (**Abb. 2k, l; Ergänz. Abb. 3m-r; Ergänz. Abb. 4m-o**). Astrogliose tritt im ZNS oft mit neuropathologischen Veränderungen, z.B. mit neurodegenerativen Erkrankungen (Alzheimer-Krankheit, Multiplen Sklerose) auf. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass in den *Srf* Mutanten verschiedene histologische Färbungen auf eine beginnende Degeneration der Axone hinwiesen.

In einem weiteren Ansatz wurde untersucht, ob die Reifung der Oligodendrocyten, die für die Myelinisierung im ZNS verantwortlich sind, möglicherweise in den *Srf* Mutanten verändert war. Genaue Analysen mit verschiedenen Markern, die die verschiedenen Stadien der Oligodendrocytenreifung kennzeichnen (**siehe auch Einleitung Abb. 1.6**), ergaben folgende Beobachtungen:

In fünf Tage alten *Srf* Mutanten (P5) traten NG2- (*nerve/glia antigen 2*) und PDGFR α (*platelet derived growth factor receptor α*)-positive Oligodendrocytenvorläuferzellen in erhöhten Mengen auf (**Ergänz. Abb. 3**). Auch in älteren Tieren (P14/P16), in einem Stadium, in dem die terminale Myelinisierung von Axonen bereits begonnen hat, wiesen *Srf* Mutanten im Vergleich zu Kontrolltieren eine erhöhte Anzahl an NG2- und PDGFR α -positiven Oligodendrocytenvorläuferzellen auf. Gleichzeitig waren in

diesem Stadium Marker, wie MBP und PLP, die reife und ausdifferenzierte Oligodendrocyten kennzeichnen, in den Mutanten reduziert (**Abb. 2a-f; Ergänz. Abb. 4**). Diese Daten zeigten, dass SRF eine wesentliche Rolle bei der Differenzierung von Oligodendrocyten übernimmt. In älteren *Srf* Mutanten lassen sich die beobachtete erhöhte Anzahl an Oligodendrocytenvorläuferzellen und die gleichzeitig verminderte Anzahl an ausgereiften myelinbildenden Oligodendrocyten eventuell dadurch erklären, dass SRF insbesondere die terminale Differenzierung von Oligodendrocyten inhibiert, wodurch es zu einer Ansammlung von Oligodendrocytenvorläuferzellen kommt.

Zusammenfassend konnte mit Hilfe der *GeneChip*-Technologie und anschließenden *in vivo*-Untersuchungen eine völlig neue Funktion von SRF in der Gehirnentwicklung festgestellt werden, in der SRF als Regulator der axonalen Myelinisierung und der Oligodendrocytendifferenzierung fungiert.

Der Einfluss von SRF auf die Oligodendrocytendifferenzierung konnte zudem zusätzlich in *in vitro*-Studien bestätigt werden. Sowohl in oligodendrocytenangereicherten Kulturen, als auch in hippocampalen Neuronen/Gliazell-Mischkulturen war die Anzahl an ausgereiften Oligodendrocyten drastisch reduziert (**Abb. 4 und 5**). Außerdem wiesen die einzelnen kultivierten Oligodendrocyten von *Srf* Mutanten eine stark verkleinerte Oberfläche auf (**Abb. 5**).

3.1.2 CTGF als Mediator der SRF-abhängigen Oligodendrocyten-differenzierung

Die bisher beschriebenen Effekte von SRF auf die Myelinisierung warfen die Frage auf, durch welchen Mechanismus neuronales SRF die Differenzierung von Oligodendrocyten beeinflussen konnte. Denn in den für diese Arbeit verwendeten *Srf* Mutanten wurde *Srf* spezifisch in den Neuronen ausgeschaltet (**Ergänz. Abb. 2**). Die *Srf* Deletion fand jedoch nicht in den myelinbildenden Oligodendrocyten statt, da in diesen die Cre-Rekombinase gar nicht exprimiert wurde (**Ergänz. Abb. 2**). Daher war SRF in den von uns verwendeten Mausstämmen in den myelinbildenden Oligodendrocyten (wenn auch schwächer als in den Neuronen) vorhanden. Folglich musste neuronales SRF durch einen indirekten, parakrinen Mechanismus auf die

Differenzierung von Oligodendrocyten gewirkt haben. Da bekannt ist, dass Neurone durch an der Zelloberfläche präsentierte oder sekretierte Signalmoleküle mit Gliazellen kommunizieren und dadurch die Myelinisierung beeinflussen können (Barres and Raff, 1999; Simons and Trajkovic, 2006), startete die Suche nach einem neuronalen Signalmolekül, welches auf parakrine Art und Weise im Wildtyp auf die Oligodendrocytendifferenzierung Einfluss nehmen konnte. Als Suchkriterien galten die Voraussetzungen, dass dieses Signalmolekül a) transkriptionell durch SRF reguliert wird, b) in der Nähe von myelinisierten Axonen exprimiert wird und c) entweder an der neuronalen Membranoberfläche lokalisiert ist oder sekretiert wird.

3.1.2.1 *Ctgf* als neues SRF-Zielgen im Gehirn

Um die Suche nach einem geeigneten Kandidaten zu erleichtern, wurden weitere *GeneChip*-Daten analysiert. Für diese experimentelle Serie wurde die Genexpression von SRF-VP16 elektroporierten corticalen Wildtypkulturen mit der Expression von Kontrollkulturen verglichen (**Ergänz. Abb. 6, Ergänz. Tabelle 2**). SRF-VP16 ist ein konstitutiv aktives SRF-Fusionsprotein (Schratt et al., 2002) und gilt als starker Transkriptionsaktivator SRF-regulierter Gene. Allerdings liefert eine SRF-VP16 induzierte Genexpression nur Hinweise darauf, ob ein Gen generell durch SRF reguliert werden kann. Sie gibt dagegen keinen Aufschluss darüber, ob ein Gen unter physiologischen Bedingungen letztendlich durch endogenes SRF aktiviert oder über einen bisher unbekanntes Mechanismus reprimiert wird (**siehe Diskussion 4.1.2**). Die Analysen der *GeneChip*-Daten entschlüsselten CTGF (*connective tissue growth factor*) als potentiellen Kandidaten, da CTGF all die oben genannten Suchkriterien erfüllte. CTGF ist ein sekretiertes, mit der extrazellulären Matrix verankertes Molekül und gehört zur CCN Familie (CTGF/Cyr61/NOV) (Chaqour and Goppelt-Struebe, 2006; Leask and Abraham, 2006; Perbal, 2004). Im Gehirn wird CTGF von Neuronen der 6. Cortexschicht sekretiert, welche in unmittelbarer Nachbarschaft zu den myelinisierten Axonen des Corpus Callosum liegen (Heuer et al., 2003) (**siehe auch Abb. 6a-d**). Die Funktionen von CTGF im Gehirn sind bisher ungeklärt. Unsere *GeneChip*-Daten und RT-PCR-Untersuchungen ergaben, dass *Ctgf* durch SRF-VP16 stark induziert wird (**Ergänz. Abb. 6**), was darauf hinwies, dass *Ctgf* generell durch SRF reguliert wird. Außerhalb des Gehirns wurde *Ctgf* bereits als SRF-Zielgen identifiziert (Philippart et al., 2004; Sun et al., 2006). Unsere Untersuchungen ergaben weiterhin, dass *Ctgf* im Gehirn von *Srf* Mutanten auf RNA-

und Protein-Ebene hochreguliert war (**Abb. 6e,i**). Darüber hinaus wiesen immunhistochemische Färbungen in den *Srf* Mutanten eine erhöhte Anzahl an CTGF- exprimierenden Zellen auf (**Abb. 6b,d**).

Die erhöhten CTGF-Mengen in den *Srf* Mutanten wiesen darauf hin, dass SRF im Wildtyp möglicherweise durch einen unbekanntem Mechanismus die Expression von *Ctgf* reprimiert. Eine reprimierende Wirkung von SRF auf die Expression von *Ctgf* konnte in der Tat in embryonalen Stammzellen gezeigt werden (**Abb. 6f**). Des Weiteren konnte die durch SRF-VP16 erzielte Induktion der *Ctgf* Expression (**Abb. 6g**) und auch die erhöhte basale Menge an *Ctgf* nach *Srf*-Deletion (**Abb. 6h**) durch ein SRF-Fusionsprotein mit der *Engrailed*-Repressor-Domäne (SRF-Eng) reduziert werden. Dies zeigt, dass SRF eventuell durch die Rekrutierung eines Repressors in der Lage ist, Genexpression, z.B. die des *Ctgf* Gens zu inhibieren (**siehe auch Diskussion 4.1.2**).

TGF β (*transforming growth factor β*) ist ein potenzieller Aktivator der *Ctgf* Expression (Chaqour and Goppelt-Struebe, 2006) und ein Modulator der Myelinisierung (Baumann and Pham-Dinh, 2001). Die Stimulierung von neuronalen Kulturen mit TGF β konnte eine Induktion von *Ctgf* in wildtypischen, nicht aber in SRF-defizienten Kulturen hervorrufen (**Abb. 6i**). Die in wildtypischen Zellen im unstimulierten basalen Zustand zuerst vorhandene reprimierende Wirkung von SRF auf den *Ctgf* Promotor konnte durch einen Stimulus wie TGF β in eine aktivierende Wirkung von SRF auf die Genexpression von *Ctgf* übergehen.

Es kann bisher zusammengefasst werden, dass CTGF als potentieller Kandidat für ein neuronales Signalmolekül, das auf Gliazellen wirkt, in Frage kam. Des Weiteren wurde *Ctgf* als SRF-reguliertes Zielgen im Gehirn identifiziert. In den *Srf* Mutanten war die Menge an CTGF erhöht, was einen Hinweis darauf lieferte, dass *Ctgf* im Wildtyp unter bestimmten Umständen durch einen bislang unbekanntem Mechanismus durch SRF reprimiert werden kann.

3.1.2.2 CTGF als Antagonist IGF-vermittelter Oligodendrocytendifferenzierung

Wie im Abschnitt zuvor erwähnt, ist CTGF im Gehirn ein von Neuronen sekretiertes Molekül mit unbekannter Funktion. Um zu untersuchen, ob CTGF als SRF-reguliertes parakrines Signalmolekül zwischen Neuronen und Gliazellen fungiert, wurde in einem nächsten Schritt *in vivo* die Wirkung von CTGF auf die Oligodendrocytendifferenzierung untersucht.

Für diese Analyse wurden neugeborene Mäuse mit Adenoviren infiziert, die entweder CTGF oder GFP (als Kontrolle) exprimierten (**Abb. 7**). Die Injektion der Viren erfolgte in die lateralen Ventrikel, wodurch die Menge an CTGF ventral des Corpus Callosum erhöht werden konnte (**Abb. 7a-e**). Nach 6 bzw. 12 Tagen wurde der Effekt der viral induzierten CTGF-Menge auf die Oligodendrocytenentwicklung untersucht. Die immunhistochemischen Färbungen zeigten, dass die viral bedingte Erhöhung der CTGF-Expression zu einer verminderten Anzahl an ausdifferenzierten Oligodendrocyten führte (**Abb. 7g,i**). Dieses *in vivo*-Experiment lieferte erste Hinweise darauf, dass eine erhöhte CTGF-Menge eventuell auf die Entwicklung von Oligodendrocyten reprimierend wirkt. Auch *in vitro* bewirkte die Zugabe von exogenem, rekombinantem CTGF eine Reduktion in der Anzahl an ausdifferenzierten Oligodendrocyten (**Abb. 8a,b**). In hippocampalen Kulturen konnte eine mögliche inhibitorische Wirkung von CTGF auf die Oligodendrocytendifferenzierung durch die Zugabe eines gegen CTGF gerichteten Antikörpers abgeschwächt werden (**Abb. 8g**).

CTGF ist auch als IGFBP8 bekannt (Kim et al., 1997). IGFBPs (*insulin growth factor binding proteins*) besitzen eine IGFBP-Bindedomäne. IGFs (*insulin growth factors*), wie z.B. IGF1, sind als Faktoren bekannt, die die Differenzierung von Oligodendrocyten fördern (Hsieh et al., 2004; McMorris et al., 1986). IGFBPs sind dagegen als Proteine bekannt, die die IGF-fördernde Wirkung auf die Oligodendrocytendifferenzierung abschwächen können, indem sie als Antagonisten wirken und IGFs durch ihre IGFBP-Bindedomäne an sich binden (Kuhl et al., 2003; Ye et al., 1995). Um zu untersuchen, ob CTGF eventuell die Oligodendrocytendifferenzierung dadurch beeinflussen kann, indem es die positive Wirkung von IGFs antagonisiert, wurden hippocampale Kulturen entweder mit IGF1 allein oder mit einem vorinkubierten Ansatz aus IGF1 und CTGF behandelt. Anschließend wurde die Anzahl an ausdifferenzierten Oligodendrocyten bestimmt. Die Auswertung ergab, dass die normalerweise durch IGF1 hervorgerufene Induktion in Anzahl und Größe ausgereifter Oligodendrocyten durch die Zugabe von CTGF verhindert wurde (**Abb. 8c-f**).

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass erhöhte Mengen an CTGF eine Reduktion in der Anzahl an ausgereiften myelinbildenden Oligodendrocyten bewirken. CTGF wurde außerdem als Faktor identifiziert, der die positive Wirkung von IGFs auf die Oligodendrocytendifferenzierung antagonisieren kann.

3.2 Ergebnisse zum Manuskript 2

Während der frühen Gehirnentwicklung bildet neuronale Motilität die Grundlage für wichtige zelluläre Prozesse, wie z.B. neuronale Migration, Neuritenwachstum und axonale Lenkung. Neuronale Motilität zeigt sich auch am Beispiel des axonalen Wachstumskegels (**siehe Manuskript 2 Abb. 1**), einer hoch dynamischen Struktur am Ende des Axons, die das auswachsende Axon zu seinen Zielzellen leitet. Die verschiedenen Formen neuronaler Motilität werden durch ein dynamisches und feinreguliertes Aktinzytoskelett gewährleistet.

In diesem Manuskript wurden die Auswirkungen einer veränderten Aktindynamik auf das Neuritenwachstum und die Wachstumskegelstruktur in Abhängigkeit von SRF untersucht. Veränderungen der Aktindynamik konnten durch den Einsatz verschiedener mutierter Aktinformen mit unterschiedlichen Polymerisationseigenschaften erzielt werden. In diesem Manuskript konnte gezeigt werden, dass Aktin-Signalgebung neuronale Motilität durch die Beeinflussung SRF-vermittelter Genexpression modulieren kann.

3.2.1 Phänotypische Besonderheiten SRF-defizienter Neurone

SRF ist als Regulator des Aktinzytoskeletts wohlbekannt (Knoll et al., 2006; Miano et al., 2007; Posern and Treisman, 2006) und sein Einfluss auf dynamische Neuronenstrukturen spiegelte sich auch im Phänotyp kultivierter SRF-defizienter Neurone wider:

Kultivierte SRF-defiziente Neurone wiesen, wie zuvor berichtet (Knoll et al., 2006), ein reduziertes Neuritenwachstum und eine veränderte Wachstumskegelstruktur auf (**Abb. 1-3**). Während die Wachstumskegel wildtypischer Neurone durch fingerförmige Filopodien gekennzeichnet waren (**Abb. 1I,K; Abb. 3A**), besaßen SRF-defiziente Neurone im unstimulierten Zustand stark vergrößerte, abgerundete Wachstumskegel ohne Filopodien (**Abb. 1M,O; Abb. 3I**). Durch ephrinA5-Behandlung konnte in wildtypischen Neuronen ein Wachstumskegelkollaps induziert werden, der durch Zusammenbruch des Zytoskeletts und Depolymerisation von F-Aktin gekennzeichnet war (**Abb. 1J,L; Abb. 3B**). Die Wachstumskegel SRF-defizienter Neurone hingegen zeigten nach ephrinA5-Behandlung keinen wirklichen Kollaps, sondern bildeten

ringförmige Strukturen aus, die aus F-Aktin und Mikrotubuli bestanden (**Abb. 1N,P; Abb. 3J**) (siehe auch (Knoll et al., 2006)).

3.2.2 Aktindynamik moduliert SRF-abhängig neuronale Motilität

Um den Einfluss zytoplasmatischer Aktindynamik auf neuronale Motilität in Abhängigkeit von SRF zu untersuchen, wurden verschiedene mutierte Aktinformen eingesetzt: G15S und S14C begünstigen im Zytoplasma die Bildung von F-Aktin, unterscheiden sich aber in ihrer Bindung zu aktinregulierenden Proteinen, wie Cofilin (Posern et al., 2004; Posern et al., 2002) (**siehe auch Diskussion im Manuskript 2**). Eine weitere mutierte Aktinform - R62D - kann nicht in F-Aktin eingebaut werden und erhöht daher den G-Aktin-Pool (Posern et al., 2002). Die Überexpression der verschiedenen Aktinformen führte in den Neuronen zu folgenden morphologischen Veränderungen:

G15S-Expression führte in wildtypischen neuronalen Kulturen zu einem Zuwachs in der Neuritenlänge, während R62D zu einer Reduktion in der Neuritenlänge führte. S14C minderte geringfügig das Neuritenwachstum (**Abb. 2**). In wildtypischen Wachstumskegeln führte G15S zu einer erhöhten Filopodienanzahl, R62D führte (obwohl in den Wachstumskegeln nicht present) zu abgerundeten Wachstumskegeln ohne Filopodien, die stark an die Wachstumskegel von *Srf* Mutanten erinnerten (**Abb. 3C,E,G**). R62D wies als weitere Besonderheit auf, dass es bei ephrinA5-behandelten wildtypischen Neuronen und auch bei nicht stimulierten SRF-defizienten Neuronen zu aktinreichen, ringförmig strukturierten Wachstumskegeln führte (**Abb. 3H,O**). In SRF-defizienten Kulturen konnten dagegen durch die mutierten Aktinformen keine Veränderungen in der Neuritenlänge oder Wachstumskegelstruktur hervorgerufen werden (Ausnahme: Einfluss von R62D in nicht stimulierten Wachstumskegeln, Abb. 3O) (**Abb. 2B,D,F,H,I; Abb. 3I-P**). Dies wies darauf hin, dass die in den Wildtypzellen durch die mutierten Aktinformen erzielten Veränderungen der neuronalen Motilität SRF-abhängig verliefen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Aktindynamik im Zytoplasma neuronale Motilität, wie Neuritenwachstum und Wachstumskegeldynamik, auf SRF-abhängige Art und Weise beeinflussen kann.

Rho-GTPasen, wie RhoA, Rac und Cdc42 sind zentrale Schaltstellen der Aktin-Regulation. Sie stehen mit vielen axonalen Lenkungsrezeptoren in Verbindung und regulieren durch die Aktivierung verschiedener Signalwege die Organisation und den Umbau des Aktinzytoskeletts. Daher sind Rho-GTPasen an zahlreichen Aspekten der neuronalen Entwicklung (Neuritenwachstum, Differenzierung, axonale Lenkung) beteiligt (Govek et al., 2005). Frühere Daten haben gezeigt, dass konstitutiv aktives RhoA Neuritenwachstum inhibiert (Knoll et al., 2006).

Rho-GTPasen wechseln zwischen einem aktiven GTP (*guanosine triphosphate*)-gebundenen und einem inaktiven GDP (*guanosine biphosphate*)-gebundenen Zustand. Die Aktivität der Rho-GTPasen wird durch GAPs (*GTPase-activating proteins*), GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) und GDIs (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*) kontrolliert (Guan and Rao, 2003; Schmidt and Hall, 2002). Im Rho Pulldown Assay (siehe 2.2.3.6) konnten im Cortex von *Srf* Mutanten erhöhte Mengen an aktiviertem Rho (der GTP-gebunden Form) festgestellt werden (**Ergänz. Abb.2**). Erhöhte Mengen an Rho könnten daher zu einer gestörten Aktinzytoskelettdynamik und einer reduzierten Neuritenlänge in den *Srf* Mutanten beitragen.

3.2.3 Aktin kann über Beeinflussung der Genexpression neuronale Motilität regulieren

Durch verschiedene, in Neuronen durchgeführte SRF-abhängige Reporter-Gen-Assays konnte gezeigt werden, dass zytoplasmatisch lokalisiertes Aktin in der Lage ist, SRF-abhängige Genexpression zu induzieren. G15S erhöhte, R62D reprimierte SRF-abhängige Luciferaseaktivität (**Abb. 4A**). Gleichzeitig konnte eine durch SRF-VP16 induzierte Luciferaseaktivität durch die zusätzliche Expression von R62D vermindert werden (**Abb. 4B**). Die Zu- bzw. Abnahme der SRF-abhängigen Luciferaseaktivität korrelierte mit der Neuritenlänge und ließ vermuten, dass Aktin über Regulation der Genexpression auf neuronale Motilität Einfluss nehmen kann. Anhand von R62D^{NLS} (NLS = *nuclear location sequence*) konnte bestätigt werden, dass Aktin neuronale Motilität über Beeinflussung der Genexpression regulieren kann. R62D^{NLS} ist nur im Zellkern lokalisiert und besitzt daher selbst keinen direkten Einfluss auf die zytoplasmatische Aktindynamik. Dennoch wurden ähnliche

Auswirkungen wie bei zytoplasmatisch exprimiertem R62D festgestellt. R62D^{NLS} reduzierte die Neuritenlänge und führte zu ähnlichen Wachstumskegelstrukturen, wie sie für die *Srf* Mutanten beschrieben wurden (**Abb. 4G-M**). R62D^{NLS} war außerdem ebenfalls in der Lage, SRF-abhängige und SRF-VP16 induzierte Luciferaseaktivität zu reduzieren (**Abb. 4N**). Umgekehrt konnte SRF-VP16 die durch R62D^{NLS} verursachte Reduktion der Neuritenlänge wieder vollständig beheben (**Abb. 4O**). Letztendlich stellte sich die Frage, durch welchen Mechanismus Aktin SRF-abhängige Genexpression beeinflussen kann. In unserem Fall wurde eine Regulation über die Translokation des SRF-Kofaktors MAL ausgeschlossen, da MAL in Neuronen nach unseren Beobachtungen ausschließlich im Nukleus vorkommt (**Ergänz. Abb. 3**). Als alternativer Mechanismus wurde festgestellt, dass R62D und R62D^{NLS} über einen unbekanntenen Mechanismus die Expression von MAL Proteinen, verschiedener Größe beeinflussen können (**Abb. 4P**). Diese könnten eventuell Neuronen-spezifische MAL-Isoformen darstellen.

3.3 Ergebnisse zum Manuskript 3

Bisherige Ergebnisse haben gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor SRF in der hippocampalen Entwicklung Neuritenwachstum, axonale Lenkung und Synapsenbildung reguliert (Knoll et al., 2006) (**siehe auch in Einleitung Abschnitt 1.2.4 und Abb. 1.9**). Im adulten Hippocampus beeinflusst SRF Formen synaptischer Plastizität, wie LTP und LTD, und ist für Lern- und Gedächtnisleistung von Bedeutung (Etkin et al., 2006; Ramanan et al., 2005).

Im nachfolgend zusammengefassten Manuskript wurde gezeigt, dass SRF noch weitere Prozesse in der frühen Hippocampusentwicklung reguliert. Diese Prozesse umfassen die Organisation von Zellen und Axonen in kompakte und voneinander getrennte Schichten („*lamination*“), die Ausbildung von dendritischen Verzweigungen und die Bildung von dendritischen Dornfortsätzen („*spines*“). Da die im Hippocampus von *Srf* Mutanten beobachteten Phänotypen *Reeler* ähnlichen Veränderungen entsprachen (**siehe Einleitung Abschnitt 1.2.2 und Abb. 1.4**), wurde außerdem eine mögliche Interaktion zwischen Reelin und SRF untersucht.

Für die Analysen neuer SRF Funktionen in der Hippocampusentwicklung wurden Zellen und Fasertrakte im Hippocampus von Kontrolltieren und konditionalen vorderhirnspezifischen *Srf* Mutanten (**siehe Einleitung Abb. 1.8**) (Alberti et al., 2005) verglichen. Um die Morphologie einzelner Neurone besser analysieren zu können, wurden die Mausstämme zusätzlich mit einer transgenen Mauslinie gekreuzt, die GFP (*green fluorescent protein*) unter der Kontrolle des *Thy1*-Promoters exprimiert (Feng et al., 2000). Der *Thy1*-Promoter ist in 14 Tage alten Mäusen u.a. in einzelnen hippocampalen Neuronen aktiv, was eine morphologische Untersuchung dieser Zellen vereinfachte.

3.3.1 SRF reguliert im Hippocampus die Ausbildung von Zell- und Faserschichten

Die Organisation von neuronalen Zellen und ihren Axonen in spezifische Zell- und Faserschichten ist ein Charakteristikum, das sich in vielen Hirnregionen, wie dem Cortex, dem Hippocampus und dem Cerebellum wiederfindet. Eine solche Anordnung scheint für die Funktionen der verschiedenen Hirnregionen äußerst bedeutend zu sein, da Fehlbildungen in der Schichtenbildung mit neuronalen Krankheiten, wie z.B. Epilepsie, in Zusammenhang gebracht worden sind (Haas et al., 2002; Nosten-Bertrand et al., 2008; Wenzel et al., 2001).

Die immunhistochemischen Untersuchungen ergaben, dass in den Hippocampi von *Srf* Mutanten Defekte im Aufbau einzelner Zell- und Faserschichten vorlagen. Zum einen konnte der bereits beschriebene axonale Lenkungsdefekt der Moosfasern (Knoll et al., 2006) durch die GFP-positiven Mäuse bestätigt werden (**siehe Abb. 1A,B**). Darüberhinaus konnte festgestellt werden, dass insbesondere die Zell- und Faserschichtung im Gyrus dentatus von *Srf* Mutanten gestört war (**Abb. 1C-L**). Wie in der Einleitung beschrieben (**siehe Einleitung Abschnitt 1.2.1.1 und Abb. 1.2**) liegen die Körnerzellen von Kontrolltieren in einer kompakten Zellkörperschicht. Eine separate Schicht aus kommissural assoziativen Fasern (C/A-Fasern) bildet mit den proximalen Teilen der Körnerzellendriten Synapsen aus (**Abb. 1C,E,G,I,K**). In den *Srf* Mutanten war die räumliche Trennung zwischen Körnerzellen und kommissural assoziativen Fasern (C/A) größtenteils aufgehoben (**Abb. 1D,F,H,J,L**). C/A-Fasern waren in einem weniger kompakten Bündel organisiert und einzelne Fasern fanden

sich innerhalb der Körnerzellschicht wieder (**Abb. 1F,J,L**). Gleichzeitig war die Körnerzellschicht aufgelockert (**Abb. 1H,L**) und viele der Zellkörper lagen ektopisch innerhalb der C/A-Faserschicht (**Abb. 1D,L**).

Des Weiteren konnte auch im Cortex von *Srf* Mutanten festgestellt werden, dass Neurone nicht mehr präzise in klar voneinander abgetrennte Schichten organisiert waren. So befanden sich in den *Srf* Mutanten viele der Smi32-positiven Neurone, die normalerweise nur in der III. und V. Cortexschicht angesiedelt sind, auch in der dazwischen liegenden IV. Cortexschicht (**Ergänz. Abb. 1C-E**).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass SRF für den Aufbau von Zell- und Faserschichten von Bedeutung ist.

3.3.2 SRF reguliert in hippocampalen CA1-Pyramidenzellen die Ausbildung von Dendriten und dendritischen Dornfortsätzen

Zusätzlich zum Gyrus dentatus wurde auch anhand der CA1-Region sichtbar, dass SRF für die Ausbildung einer kompakten Zellschicht von Bedeutung ist. Die CA1-Zellkörperschicht in den *Srf* Mutanten war insgesamt aufgelockert, d.h. die einzelnen Neurone waren nicht in einer so kompakten Schicht, wie sie im Wildtyp vorliegt, organisiert (**Abb. 2C,D**). Weitere morphologische Untersuchungen GFP-exprimierender CA1-Neurone enthüllten auffällige Veränderungen in der Dendritenstruktur. Die Dendriten von Pyramidenzellen lassen sich, wie in der Einleitung beschrieben, in basale und apikale Dendriten einteilen (**siehe Einleitung 1.2.1.2 und Abb. 1.3**). Innerhalb der CA1-Zellkörperschicht von Kontrolltieren findet außerdem kein laterales Dendritenwachstum statt, und der apikale Hauptast beginnt erst unterhalb der Zellkörperschicht damit, weitere Dendritenverzweigungen auszubilden (**Abb. 2C,E,G**). In den *Srf* Mutanten war die klare Orientierung von basalen (ins *Str. oriens* orientierten) und apikalen (ins *Str. radiatum* orientierten) Dendriten aufgehoben (**Abb. 2D,F,H**). Zusätzlich wiesen die CA1-Neurone der *Srf* Mutanten innerhalb der CA1-Zellkörperschicht ektopisches dendritisches Wachstum auf (**Abb. 2D,F,H**). Aus den Zellkörpern der CA1-Neurone wuchsen seitliche Dendrite aus, und der apikale Hauptast spaltete sich viel früher in zwei Hauptäste auf oder bildete bereits innerhalb der Zellkörperschicht laterale Verzweigungen aus. Des Weiteren erschien auch die gesamte Komplexität des apikalen dendritischen Astes in

den *Srf* Mutanten reduzierter, was durch eine Färbung mit dem Dendritenmarker Map2 bestätigt werden konnte (**Abb. 2I,J**). Insbesondere die haarbüschelförmigen dendritischen Verzweigungen am Ende des aufgeteilten apikalen Hauptastes waren in den *Srf* Mutanten drastisch reduziert (**Abb. 2I,J**). Im Gegensatz zur immunhistochemischen Färbung (**Abb. 2I-J**) wies ein gegen Map2 gerichteter Western Blot mit hippocampalem Gewebelysate in den *Srf* Mutanten zwar eine signifikante, aber nur geringfügige Reduktion von Map2 auf (**Ergänz. Abb. 2**). Dies wies darauf hin, dass sich das reduzierte Wachstum und Verzweigen von Dendriten weitestgehend auf die apikalen Dendriten der CA1-Region beschränkte, was auch mit den histologischen Beobachtungen übereinstimmte, in denen andere Dendrite, z.B. die Dendrite der Körnerzellneurone keine auffälligen Reduktionen aufwiesen.

In vitro konnte in SRF-defizienten hippocampalen Kulturen ebenfalls reduziertes Wachstum und Verzweigen von Dendriten beobachtet werden, welches durch die Elektroporation der Kulturen mit SRF-VP16, einem konstitutiv aktiven SRF-Konstrukt, wieder hergestellt werden konnte (**Ergänz. Abb. 3**).

In einem nächsten Schritt wurde die Ausbildung von dendritischen Dornfortsätzen („*spines*“) in den basalen und apikalen Dendriten von CA1-Pyramidenzellen untersucht. *Spines* bilden wie bereits erwähnt den postsynaptischen Teil einer Synapse (**siehe Einleitung 1.2.1.3**). Die Untersuchungen ergaben, dass die Anzahl an dendritischen *spines* in den *Srf* Mutanten sowohl in basalen, als auch in apikalen Dendriten signifikant reduziert war (**Abb. 2K,L**).

3.3.3 Untersuchungen einer möglichen Interaktion zwischen der Reelin-Signalkaskade und SRF-vermittelter Genexpression

Da die im Hippocampus von *Srf* Mutanten beobachteten Phänotypen (wie Defekte im Aufbau von Zell- und Faserschichten, reduziertes und morphologisch verändertes Dendritenwachstum, reduzierte Anzahl an dendritischen Dornfortsätzen) stark an Mausmutanten des Reelin-Signalweges erinnerten (**siehe auch Einleitung Abb. 1.4**) (Deller et al., 1999b; Gebhardt et al., 2002; Niu et al., 2004; Niu et al., 2008; Rice and Curran, 1999; Stanfield and Cowan, 1979), wurde eine mögliche Interaktion zwischen SRF und Reelin analysiert.

Als erstes wurde untersucht, ob SRF möglicherweise auf Reelin und die Reelin-Signalkaskade Einfluss ausüben kann. SRF könnte z.B. auf die Lokalisation von Reelin wirken oder Komponenten der Reelin-Signalkaskade transkriptionell regulieren. Untersuchungen ergaben, dass in den *Srf* Mutanten die Migration und damit Lokalisation Reelin-exprimierender Zellen in der Tat verändert war: Die Anzahl an Reelin-exprimierenden Zellen, die überhalb der CA1-Zellkörperschicht lokalisiert sind (im sog. *Stratum oriens*), war reduziert. Gleichzeitig befanden sich aber vermehrt ektopische Reelin-exprimierende Zellen innerhalb der CA1-Zellkörperschicht (im sog. *Stratum pyramidale*) (**Abb. 3**). Der Vergleich zwischen Kontrollmäusen und *Srf* Mutanten in der Genexpression bekannter Reelin-Signalkaskadekomponenten durch RT-PCR erbrachte keinen Unterschied, was darauf schließen ließ, dass SRF kein transkriptioneller Hauptregulator von Reelin-Signalkaskademolekülen ist (**Abb. 4**).

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass SRF auf die Reelin-Signalkaskade wirken kann, indem SRF die Lokalisation von Reelin, nicht aber die Transkription von Reelin-Signalkaskademolekülen beeinflusst.

In einem weiteren Ansatz wurde untersucht, ob SRF möglicherweise am Ende der Reelin-Signalkaskade eine Rolle spielt, und z.B. eine durch Reelin induzierte Genexpression regulieren kann. Um zu untersuchen, ob Reelin SRF-vermittelte Genexpression induzieren kann, wurden aus Kontrolltieren und *Srf* Mutanten corticale Kulturen hergestellt. Nach dreitägiger Inkubationsphase wurde ein Teil der Kulturen mit rekombinantem Reelin stimuliert. Das Reelin stammte aus dem Überstand einer stabil Reelin-exprimierenden HEK293-Zelllinie. Ein anderer Teil der Zellen wurde mit einem Kontrollüberstand, der von einer GFP-exprimierenden HEK293-Zelllinie stammte, behandelt. Anschließend RT-PCR-Analysen ergaben, dass durch Reelin Stimulation einige SRF-Zielgene leicht, andere stärker, induziert werden konnten (**Abb. 5; Ergänz. Abb. 4; Ergänz. Abb. 5**). Hierzu zählten einerseits *immediate early genes*, wie *Egr-1*, *Egr-2*, *c-Fos*, *Arc* und *Srf*, andererseits wurden auch zytoskeletale Gene, wie *Acta2*, *Tpm2b*, *Flna* und *Arc*, durch Reelin induziert. *Arc* gehört sowohl zu den IEGs als auch zu den zytoskeletalen Genen. Die Reelin induzierte Transkription dieser Gene erfolgte SRF-abhängig, da die beobachtete Induktion nur in den wildtypischen Kulturen, nicht aber in den SRF-defizienten Kulturen stattfand. Unabhängig davon konnte mit einem Reporteragen-Assay

ebenfalls gezeigt werden, dass Reelin SRF-abhängige Reporter-genaktivität beeinflusst (**Ergänz. Abb. 6**). *p53* spielt in Apoptose, aber auch für neuronale Motilität eine Rolle (Tedeschi and Di Giovanni, 2009). Interessanterweise wurde *p53* durch Reelin reprimiert.

Neben einer Rolle von SRF als transkriptioneller Regulator Reelin-induzierter Genexpression wurde zusätzlich untersucht, ob SRF auch für Reelin-induzierte Zellmotilität benötigt wird. Reelin ist als Faktor bekannt, der das Wachstum und das Verzweigen von Neuriten stimuliert (Niu et al., 2004). Um zu untersuchen, ob Reelin-induziertes Neuritenwachstum SRF-abhängig verläuft, wurden hippocampale Kulturen aus Kontrolltieren und *Srf* Mutanten hergestellt. Diese wurden mit Reelin-haltigem bzw. mit Kontrollüberstand behandelt. Anschließend wurde das Auswachsen und Verzweigen der Neurite in Abhängigkeit von SRF analysiert (**Abb. 6**). Die Auswertung ergab, dass Reelin Neuritogenese in wildtypischen Kulturen, nicht aber in SRF-defizienten Kulturen stimulieren kann.

Umgekehrt zeigten hippocampale Kulturen, die aus *Reeler* Mutanten isoliert worden waren, im Vergleich zu Wildtypkulturen vermindertes Wachstum und Verzweigen von Neuriten auf (Niu et al., und **Abb. 7**). Diese Reduktion konnte durch konstitutiv aktives SRF-VP16, das durch adenovirale Transfektion in die kultivierten Zellen eingeschleust wurde, wieder hergestellt werden (**Abb. 7**). Durch Transfektion der Zellen mit dem inaktiven SRF-VP16 Δ MADS Konstrukt konnte das Neuritenwachstum in den Reelin-defizienten Kulturen nicht induziert werden. Zusammenfassend wiesen die Befunde darauf hin, dass Reelin und SRF möglicherweise in einem gemeinsamen Signalweg interagieren.

4 Diskussion

4.1 Diskussion zum Manuskript 1

4.1.1 SRF reguliert die Oligodendrocytendifferenzierung über einen parakrinen Mechanismus

Innerhalb dieser Arbeit wurden durch die Anwendung von *GeneChips* zahlreiche myelinbildende und oligodendrocytenspezifische Gene identifiziert, deren Expression durch SRF beeinflusst wird (**Abb. 1; Ergänzungstabelle 1**). Ergänzende histologische Untersuchungen ergaben, dass neuronales SRF maßgeblich am Aufbau der axonalen Myelinisierung beteiligt ist und als Regulator in der Oligodendrocytendifferenzierung fungiert (**Abb. 2-4; Ergänz. Abb. 3 und 4**).

Aus bisherigen Forschungsberichten ist bekannt, dass Neurone durch parakrine Mechanismen die Differenzierung von Oligodendrocyten und die Myelinisierung von Axonen beeinflussen können (Barres and Raff, 1999; Simons and Trajkovic, 2006). So können Neurone indirekt durch Signalmoleküle, die auf der neuronalen Zelloberfläche lokalisiert sind oder von Neuronen sekretiert werden, Einfluss auf die Differenzierung und Myelinisierung benachbarter Oligodendrocyten nehmen (**siehe Einleitung 1.2.3.3 und Abb. 1.7**). Da in den von uns verwendeten *Srf* Mutanten SRF nur in den Neuronen, nicht aber in den myelinbildenden Oligodendrocyten ausgeschaltet wurde (**Ergänz. Abb. 2**), und es dennoch zu Defekten in der Myelinisierung kam, lag die Vermutung nahe, dass in wildtypischen Mäusen neuronales SRF über einen parakrinen Mechanismus auf die Oligodendrocytendifferenzierung wirkt. Bei der Suche nach einem neuronalen Signalmolekül, das über einen parakrinen Weg auf Oligodendrocyten wirkt und dessen Expression außerdem von SRF reguliert wird, wurde CTGF als möglicher Kandidat identifiziert. CTGF ist ein sekretiertes Protein und wird im Gehirn von Neuronen der 6. Cortexschicht gebildet (**Abb. 6**). Die Mengen von CTGF waren in den *Srf* Mutanten erhöht (**Abb. 6**). Durch anschließende Untersuchungen wurde die

bisher unbekannte Eigenschaft von CTGF entdeckt, dass CTGF in erhöhten Mengen *in vivo* und *in vitro* inhibitorisch auf die Differenzierung von Oligodendrocyten wirkt (**Abb. 7 und 8**). Weitere Analysen ergaben, dass CTGF auf die Insulinsignalgebung Einfluss nimmt, indem es IGFs, wie z.B. IGF1 abfängt und an sich bindet (**Abb. 8**). Dadurch antagonisiert CTGF die myelinfördernde Wirkung von IGFs.

Zusammenfassend konnte eine völlig neue Rolle von SRF in der Gehirnentwicklung entdeckt werden. Hierbei reguliert SRF-vermittelte Transkription auf parakrine Art und Weise die Differenzierung von Oligodendrocyten und beeinflusst die axonale Myelinisierung im Gehirn. CTGF wurde als neuronales Signalmolekül entdeckt, welches durch SRF reguliert wird und auf parakrine Weise die Differenzierung von Oligodendrocyten steuern kann, indem es auf die Insulinsignalgebung wirkt.

Die Regulation über CTGF stellt nur einen möglichen Mechanismus dar, wie SRF auf die Myelinisierung und Oligodendrocytendifferenzierung wirken kann. Da die Expression von CTGF im Gehirn auf die 6. Schicht des Kortex limitiert ist, ist es wahrscheinlich, dass SRF die Myelinisierung und Oligodendrocytendifferenzierung in anderen Hirnregionen durch weitere, CTGF-unabhängige, Mechanismen beeinflusst. Unsere Untersuchungen wiesen z.B. auf eine beginnende axonale Degeneration in den *Srf* Mutanten hin (**Abb. 2; Ergänz. Abb. 5**), die ebenfalls zu einer Reduktion der Myelinisierung beitragen könnte. Außerdem wiesen *GeneChip*-Daten (**Ergänz. Abb. 6**) darauf hin, dass SRF die Transkription von IGFs und IGFbPs reguliert, wodurch - unabhängig von CTGF - die Myelinisierung beeinflusst werden könnte. Des Weiteren könnte SRF auf die Migration von OPCs (Oligodendrocytenvorläuferzellen) wirken. Oligodendrocyten entstehen u.a. in der Subventrikulären Zone. Wie bereits erwähnt (**siehe Einleitung 1.2.4 und Abb. 1.9**), besteht in *Srf* Mutanten ein Migrationsdefekt von neuronalen Vorläuferzellen der subventrikulären Zone, die normalerweise zum Olfaktorischen Bulbus wandern (Alberti et al., 2005). Auch in unseren histologischen Untersuchungen konnte eine vergrößerte Subventrikuläre Zone festgestellt werden, in der sich Oligodendrocytenvorläuferzellen ansammelten (**Abb. 2, Ergänz. Abb. 3**). Daher ergibt sich generell auch die Möglichkeit, dass SRF auf die Migration von OPCs Einfluss nimmt und dadurch die Myelinisierung von Axonen beeinflusst.

4.1.2 Mechanismen SRF-vermittelter Transkriptionsregulation

CTGF wurde im Rahmen dieser Arbeit als neues SRF-Zielgen im Gehirn identifiziert. In *Srf* Mutanten wurde *Ctgf* auf RNA- und Proteinebene verstärkt exprimiert (**Abb. 6**). Durch einen externen Stimulus wie TGF β konnte *Ctgf* aber SRF-abhängig induziert werden (**Fig. 6i**). Auch für andere SRF-Zielgene, wie z.B. *c-Fos* und *Cyr61*, wurde beobachtet, dass SRF im basalen Zustand durch einen bisher unbekanntem Mechanismus die Expression dieser Gene reprimiert, da in *Srf* Mutanten die Expression dieser Gene erhöht war. Gleichzeitig konnten diese Gene aber nach einem bestimmten Stimulus, wie z.B. Serum, durch SRF auch wieder aktiviert werden (Daten nicht veröffentlicht). Des Weiteren wurde auch in den *GeneChip*-Experimenten eine Reihe von Genen in den *Srf* Mutanten stärker exprimiert als im Wildtyp (**Abb. 1b; Ergänz. Tabelle 1**).

Zusammenfassend wird anhand dieser Beobachtungen deutlich, dass SRF möglicherweise nicht nur als Transkriptionsaktivator von Genen fungiert, sondern auch durch bisher unbekanntem Mechanismen die Repression von Genen bewirkt. Eine SRF-vermittelte Repression von Genen kann durch unterschiedliche Mechanismen verursacht werden. Zum einen könnte SRF selbst als Repressor agieren. Bisher wurde allerdings keine Repressordomäne im SRF-Protein annotiert. Zum anderen könnte SRF aber auch durch die Rekrutierung von Korepressoren die Expression von Genen inhibieren. In der Einleitung (**siehe 1.1.2**) wurde bereits darauf hingewiesen, dass TCFs, wie ELK-1, sowie FHL2, HOP und HDACs als Korepressoren von SRF agieren. Mit großer Wahrscheinlichkeit spielt die Zusammensetzung des regulatorischen Proteinkomplexes am Promotor eine entscheidende Rolle, ob ein Gen in Abhängigkeit bestimmter Bedingungen induziert oder reprimiert wird. Die An- bzw. Abwesenheit von SRF und Koaktivatoren oder Korepressoren am Promotor könnte nach einem externen Stimulus, wie Serum oder TGF β verändert werden, wodurch die Expression von Genen reguliert wird (Buchwalter et al., 2004).

Auch der Phosphorylierungszustand von SRF und TCFs stellt eine Möglichkeit dar, wie die Aktivierung bzw. Repression von Genen beeinflusst werden kann (Ernst et al., 1995; Zinck et al., 1993).

Des Weiteren könnte SRF die Repression von Genen bewirken, indem SRF miRNAs (*microRNAs*) aktiviert. miRNAs sind kurze, nicht kodierende RNA-Moleküle, die über

komplementäre Basenpaarung die Translation der mRNA (*messenger* RNA) hemmen oder zur Degradation der mRNA führen (He and Hannon, 2004). Eine SRF-vermittelte Regulation von miRNAs wurde außerhalb des Gehirns, im Herz, bereits entdeckt (Niu et al., 2007).

Schließlich besteht noch die weitere Möglichkeit, dass SRF auf indirekte Weise über einen dazwischengeschalteten Transkriptionsfaktor die Expression von Genen beeinflusst. In diesem Fall würde SRF nicht selbst an den Promotor des Zielgens binden, sondern könnte indirekt über die transkriptionelle Regulation eines dazwischengeschalteten Transkriptionsfaktors die Aktivität von Zielgenen steuern.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass SRF *in vivo* durch ein komplexes Zusammenspiel mit verschiedenen Kofaktoren die Expression von Genen, wie z.B. *Ctgf*, auf direkte oder indirekte Weise reguliert und dadurch sowohl die Aktivierung als auch Repression von Genen herbeiführen kann.

Das komplexe Zusammenspiel, das *in vivo* zwischen endogenem SRF und anderen Proteinen am Promotor von SRF-Zielgenen stattfindet, kann daher auch nicht mit der Wirkung von SRF-VP16 gleichgesetzt werden. Am Beispiel von *Ctgf* zeigte sich, dass *Ctgf in vivo* über einen unbekanntem Mechanismus durch endogenes SRF reprimiert wird, während *Ctgf* durch SRF-VP16 induziert werden konnte (**Ergänz. Abb. 6**). SRF-VP16 wirkt durch die Fusion mit der viralen VP16-Domäne vor allem als starker Transkriptionsaktivator. Die Wirkung des konstitutiv aktiven SRF-VP16 Proteins auf die Genexpression ist daher von der *in vivo* Situation zu unterscheiden, da unter physiologischen Bedingungen, wie eben beschrieben, die Transkription in der Regel durch ein komplexes Zusammenspiel vieler verschiedener Faktoren moduliert wird.

4.2 Diskussion zum Manuskript 2

Neuronale Motilität basiert auf der dynamischen Eigenschaft des Aktinzytoskeletts. Als Aktindynamik wird dabei die Fähigkeit von Aktin bezeichnet, sich zu filamentösem Aktin zusammenzulagern (= Aktinpolymerisation) oder in monomere Bausteine zu dissoziieren (= Aktindepolymerisation).

SRF ist als Transkriptionsfaktor bekannt, der durch die Regulation von zytoskeletalen Genen maßgeblichen Einfluss auf die Dynamik des Zytoskeletts besitzt (Knoll and Nordheim, 2009; Miano et al., 2007; Posern and Treisman, 2006). In verschiedenen Zelltypen, z.B. in Fibroblasten wurde außerdem gezeigt, dass umgekehrt auch die Dynamik des Aktinzytoskeletts die Aktivität SRF-vermittelter Genexpression beeinflusst, indem die Aktindynamik die Translokation des SRF-Kofaktors MAL in den Nukleus reguliert (Settleman, 2003). SRF besitzt somit die besondere Eigenschaft, als Transkriptionsfaktor durch Aktin-Signalgebung reguliert zu werden und wiederum selbst Aktindynamik transkriptionell zu beeinflussen.

Im Manuskript 2 wurde gezeigt, dass die Aktin-Signalgebung auch in Neuronen auf SRF-vermittelte Transkription Einfluss ausübt und dadurch neuronale Motilität reguliert.

Durch den Einsatz verschiedener mutierter Aktinformen mit unterschiedlichen Polymerisationseigenschaften konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte Polymerisation von Aktin im Zytoplasma neuronale Motilität SRF-abhängig stimuliert und gleichzeitig die Aktivität SRF-vermittelter Genexpression erhöht (**Abb. 2-4**). Umgekehrt bewirkte die Depolymerisation von F-Aktin eine Reduktion neuronaler Motilität und führte zu einer Reduktion der SRF Aktivität (**Abb. 2-4**). Neuronale Motilität korrelierte daher mit der Aktivierung bzw. Inaktivierung SRF-vermittelter Genexpression (**Abb. 4**).

Durch welchen Mechanismus zytoskeletales Aktin in der Lage war, die Aktivität von SRF zu beeinflussen, wurde innerhalb dieser Arbeit nicht vollständig aufgedeckt. Unsere Untersuchungen (**Ergänz. Abb. 3**) und Daten einer anderen Forschungsgruppe (Kalita et al., 2006) weisen darauf hin, dass MAL in Neuronen konstitutiv im Nukleus vorkommt und daher in Neuronen nicht als Verbindungsmolekül zwischen zytoplasmatisch lokalisiertem Aktin und SRF in Betracht kommt. Diese Daten stehen im Kontrast zu einer weiteren Forschungsgruppe, die in Neuronen eine Translokation von MAL in den Nukleus beobachtete (Tabuchi et al., 2005). Insgesamt betrachtet ist daher eine Aktin-vermittelte Beeinflussung der SRF Aktivität über die Translokation von MAL in den Nukleus in Neuronen noch umstritten. Innerhalb dieser Arbeit konnte aber festgestellt werden, dass zytoskeletales und auch nukleär lokalisiertes Aktin in der Lage ist, die Expression von MAL-Proteinen verschiedener Größe zu beeinflussen (**Abb. 4P**).

Weiterhin wurde mit der ektopischen Überexpression einer mutierten Aktinform, die nur im Nukleus vorkommt gezeigt, dass nukleär lokalisiertes Aktin ebenfalls SRF-abhängige Genexpression beeinflusst und dadurch neuronale Motilität regulieren kann. So bewirkte die Überexpression von R62D^{NLS} die Reduktion neuronaler Motilität und reduzierte gleichzeitig SRF-abhängige Luciferaseaktivität (**Abb. 4**). Aus bisher publizierten Daten geht hervor, dass Aktin *in vivo* in der Tat nicht nur im Zytoplasma, sondern auch im Nukleus vorkommt (McDonald et al., 2006). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass nukleäres Aktin (wie auch Myosin) aktiv an der Transkription von Genen beteiligt sein kann (Grummt, 2006; Philimonenko et al., 2004). Die Forscher postulierten, dass nukleäres Aktin (und Myosin) direkt mit der RNA-Polymerase assoziiert und durch Strukturveränderungen der RNA-Polymerase den Transkriptionsstart und das Ablesen von genetischer Information beeinflusst. In Fibroblasten wurde außerdem gezeigt, dass nukleäres Aktin auch die Aktivität von MAL beeinflusst und den nukleären Export von MAL erleichtern kann (Vartiainen, 2008; Vartiainen et al., 2007).

Zusammenfassend bestätigen unsere Ergebnisse bisherige Daten, dass Aktin nicht nur Bestandteil des Zytoskeletts ist, sondern auch genregulatorische Funktionen besitzt.

Im Manuskript 2 und in anderen Veröffentlichungen wurde gezeigt, dass SRF-defiziente Neurone Störungen in der Wachstumskegeldynamik und reduziertes Neuritenwachstum aufweisen (**Abb. 1-3**) (Knoll et al., 2006). Innerhalb dieser Arbeit wurden in *Srf* Mutanten erhöhte Mengen der kleinen GTPase RhoA festgestellt (**Ergänz. Abb. 2**). Rho-GTPasen sind wie erwähnt (**siehe 3.2.2**) zentrale Schaltstellen der Aktin-Regulation und beeinflussen in bestimmten Zellen, wie z.B. in Fibroblasten außerdem die Translokation von MAL in den Nukleus (Settleman, 2003). Die beobachteten erhöhten RhoA-Mengen in *Srf* Mutanten passen zu früheren Daten, in denen gezeigt wurde, dass in wildtypischen Zellen konstitutiv aktives RhoA mit einer Reduktion der Neuritenlänge einhergeht (Knoll et al., 2006).

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass auch in Neuronen zytoplasmatische Aktindynamik - über einen wahrscheinlich neuartigen Mechanismus - und nukleär lokalisiertes Aktin auf SRF-vermittelte Genexpression Einfluss nehmen, wodurch neuronale Motilität beeinflusst wird.

4.3 Diskussion zum Manuskript 3

4.3.1 SRF als Regulator der hippocampalen Entwicklung

Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass SRF in der frühen Hippocampusentwicklung Neuritenwachstum, axonale Lenkung und Synapsenbildung reguliert (Knoll et al., 2006). Im adulten Hippocampus der Maus beeinflusst SRF synaptische Plastizität, Lernen und Gedächtnis (Etkin et al., 2006; Ramanan et al., 2005). Innerhalb dieser Arbeit wurden weitere Funktionen von SRF bei verschiedenen Prozessen der hippocampalen Entwicklung entdeckt.

Zum einen konnte anhand von histologischen Untersuchungen gezeigt werden, dass SRF im Hippocampus zum präzisen Aufbau der einzelnen Zell- und Faserschichten beiträgt (**Abb. 1**). Zum anderen wurde SRF als Transkriptionsfaktor identifiziert, der im Hippocampus Dendritenwachstum und die Bildung von dendritischen Dornfortsätzen (*spines*) reguliert (**Abb. 2**).

Viele Prozesse in der Hippocampusentwicklung wie neuronale Migration, Neuritenwachstum und axonale Lenkung basieren auf einem feinregulierten, dynamischen Aktinzytoskelett. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass die im Gehirn von *Srf* Mutanten beschriebenen Defekte, wie z.B. der Migrationsdefekt von neuronalen Vorläuferzellen im *rostral migratory stream* (Alberti et al., 2005) oder das in SRF-defizienten Neuronen beobachtete reduzierte Neuritenwachstum und die gestörte Wachstumskegeldynamik nach ephrin-A5-Behandlung (Knoll et al., 2006), mit Veränderungen in der Expression und Aktivität aktinzytoskeletaler Gene bzw. Proteine einherging. So zeigten *Srf* Mutanten eine verminderte Expression von Gelsolin und Aktin auf, während das Aktin schneidende Protein Cofilin inhibiert wurde (Alberti et al., 2005). Auch die in diesem Manuskript geschilderten Entwicklungsprozesse, wie Körnerzellmigration, axonales und dendritisches Wachstum und die Bildung bzw. Dynamik von *spines*, benötigen als Grundlage ein funktionstüchtiges Aktinzytoskelett. Daher passen die in den *Srf* Mutanten neu entdeckten hippocampalen Entwicklungsdefekte zu den bisher bekannten Daten und könnten ebenfalls durch Störungen in der Aktinzytoskelettdynamik entstanden sein. *Filamin α* wurde außerdem als neues aktinregulierendes SRF-Zielgen im Gehirn entdeckt (**Abb. 4**). Filamine, wie *Filamin α* sind aktinbindende Proteine, die an der

Quervernetzung von Aktinfilamenten, sowie an der Vernetzung von Aktinfilamenten mit Proteinen in der Zellmembran beteiligt sind und somit auf Zellmotilität, Zell-Zell und Zell-Matrixverbindungen wirken (Feng and Walsh, 2004; Popowicz et al., 2006).

Dendritische *spines* sind aktinreiche Strukturen. Die in den *Srf* Mutanten beobachtete verminderte Anzahl an *spines* könnte daher - wie eben erwähnt – generell durch eine gestörte Aktinzytoskelettdynamik oder durch reduzierte Aktinmengen entstanden sein. Da die Bildung von *spines* auch durch synaptische Aktivität, wie LTP und LTD reguliert (Engert and Bonhoeffer, 1999; Yuste and Bonhoeffer, 2001) wird, könnte die verminderte *spine* Anzahl in den Mutanten auch durch Störungen in LTP und LTD verursacht werden und eine Konsequenz verminderter Lern- und Gedächtnisfähigkeit darstellen. Aus bisher publizierten Daten ist bereits bekannt (Ramanan et al., 2005), dass die Deletion von *Srf* in adulten Tieren in der Tat zu einer Reduktion von LTP führt und Störungen in LTD und Lern- und Gedächtnisleistung hervorruft (**siehe 1.2.4**).

Da der Hippocampus eine wichtige Hirnregion für Lern- und Gedächtnisprozesse ist, liegt es umgekehrt auch nahe, dass Entwicklungsstörungen im Hippocampus, wie z.B. Veränderungen in Neuronenverschaltungen, zu funktionalen Störungen des Hippocampus führen können. Durch die Körnerzelldispersion im Gyrus dentatus, den axonalen Lenkungsdefekt der C/A- und Moosfasern und durch die veränderte Dendritenmorphologie der CA1-Neurone, ist es sehr wahrscheinlich, dass in den *Srf* Mutanten Veränderungen von Neuronenverschaltungen vorliegen. Eine veränderte Verschaltung von Neuronen kann letztendlich die elektrische Weiterleitung und Verarbeitung von Informationen beeinflussen. Daher ist es möglich, dass die in den *Srf* Mutanten beobachteten Störungen der Hippocampusentwicklung, sich auf die funktionalen Eigenschaften des Hippocampus, zu denen Lernen und Gedächtnis zählen, auswirken könnten. Da die in unserem Labor verwendeten konditionalen *Srf* Mutanten bereits im Alter von ca. drei Wochen sterben (Alberti et al., 2005), war es allerdings nicht möglich, diese Mäuse für Lern- und Gedächtnisstudien einzusetzen.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit die Rolle von SRF als wichtiger Regulator der hippocampalen Entwicklung bestätigt und erweitert werden.

4.3.2 Untersuchung einer möglichen Interaktion zwischen Reelin und SRF-vermittelter Genexpression

Die im Hippocampus von *Srf* Mutanten beobachteten Entwicklungsstörungen weisen starke Ähnlichkeiten zu verschiedenen Mutanten des Reelin-Signalweges auf (Deller et al., 1999b; Gebhardt et al., 2002; Niu et al., 2004; Niu et al., 2008; Rice and Curran, 1999; Stanfield and Cowan, 1979). Zu den Ähnlichkeiten zählen die Entwicklungsdefekte im Gyrus dentatus mit Körnerzelldispersion und axonalem Lenkungsdefekt der C/A-Fasern, der axonale Lenkungsdefekt der Moosfasern, das reduzierte und veränderte Dendritenwachstum und die reduzierte Anzahl an dendritischen *spines* (**siehe Einleitung Abb. 1.4**). Aufgrund der vielen beobachteten Gemeinsamkeiten wurde eine mögliche Interaktion zwischen Reelin und SRF untersucht. Bei den Untersuchungen wurde einerseits die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass SRF auf Reelin und die Reelin-Signalkaskade wirken könnte, indem SRF z.B. die Lokalisation von Reelin-exprimierenden Zellen beeinflusst, oder indem SRF Komponenten der Reelin-Signalkaskade transkriptionell reguliert. Andererseits wurde auch die Möglichkeit untersucht, ob eine Reelin-initiierte Signalkaskade auf SRF-vermittelte Genexpression Einfluss nehmen kann.

Die Untersuchungen ergaben, dass SRF nicht die Expression von Komponenten der Reelin-Signalkaskade reguliert (**Abb. 4**), allerdings beeinflusste SRF die Lokalisation von Reelin in der CA1-Region des Hippocampus (**Abb. 3**). So befanden sich u.a. in den *Srf* Mutanten vermehrt ektopische, Reelin-exprimierende Zellen zwischen den Zellkörpern der CA1-Neurone. Reelin ist als neuritenwachstumsfördernder Faktor bekannt und - passend dazu - korreliert *in vivo* die Verteilung von Reelin-exprimierenden Zellen im Hippocampus stark mit dem Dendritenwachstum bzw. der Dendritenorientierung von hippocampalen Neuronen. Deshalb lassen diese Beobachtungen vermuten, dass das in unseren *Srf* Mutanten innerhalb der CA1-Zellkörperschicht festgestellte ektopische Dendritenwachstum und die Misorientierung von basalen und apikalen Dendriten (**Abb. 2**), möglicherweise durch die Mislokalisierung von Reelin innerhalb der CA1-Zellkörperschicht verursacht wurde. Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass SRF auf Reelin und die Reelin-Signalkaskade Einfluss nehmen kann, indem SRF auf die Lokalisation von Reelin wirkt.

Die Untersuchungen, ob eine Reelin-initiierte Signalkaskade auf SRF-vermittelte Transkription wirken kann, ergaben, dass Reelin in Abhängigkeit von SRF, die Expression einiger IEGs und zytoskeletaler Gene induzieren kann (**Abb. 5, Ergänz. Abb. 4 und 5**). Gene, wie *Acta* und *Tpm2b* wurden durch Reelin leicht, andere Gene, wie *Egr-2* und *Arc* wurden durch Reelin stärker induziert. Die Induktion von SRF-Zielgenen durch Reelin erfolgte wesentlich schwächer als eine durch BDNF erzielte Induktion (**Ergänz. Abb. 4**). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass BDNF kommerziell und in aufgereinigter Form erworben wurde. Das Reelin stammte dagegen aus dem relativ „unreinen“ Überstand Reelin-exprimierender HEK293-Zellen. Bereits der Kontrollüberstand der GFP-exprimierenden HEK293-Zelllinie führte zu erhöhten Expression von Genen, so dass möglicherweise der induzierte Effekt durch Reelin zum Teil überlagert wurde. Die SRF-vermittelte Induktion von zytoskeletalen Genen durch Reelin stellt prinzipiell eine neue Möglichkeit dar, wie Reelin während der Gehirnentwicklung auf die Migration von Neuronen Einfluss nehmen kann. Durch die Induktion von zytoskeletalen Genen, wie *Acta2*, *Flna*, *Tpm2b* und *Arc* besitzt Reelin die Möglichkeit die Dynamik des Aktinzytoskeletts zu verändern. Eine Hochregulierung diese Gene könnte ähnlich, wie die durch Reelin verursachte Phosphorylierung von Cofilin (Chai et al., 2009) zu einer Stabilisierung des Aktinzytoskeletts führen. Eine Stabilisierung des Zytoskeletts spielt z.B. in der somatischen Translokation, während der Zellmigration zur Verankerung des Leitfortsatzes eines Neurons mit der Oberfläche, eine Rolle (siehe auch Diskussion in (Chai et al., 2009)).

Eine Induktion des IEGs *Egr-1* durch Reelin wurde zuvor bereits berichtet (Simo et al., 2007) und entsprach unseren Ergebnissen (**Abb. 5, Ergänz. Abb. 4 und 5**). Die Induktion von IEGs durch Reelin weist darauf hin, dass Reelin für verschiedene Funktionen im Hippocampus von Bedeutung sein könnte. Zum einen beeinflussen Transkriptionsfaktoren, wie *Egr-1*, die Transkription vieler anderer Gene, wie z.B. von *p35* (besitzt auch Funktion in Zellmigration) oder *p53* (Funktion in Apoptose). Des Weiteren spielen IEGs, wie *Egr-1* oder *Arc* bei LTP und Gedächtnisbildung eine Rolle (Jones et al., 2001; Lee et al., 2004). Frühere Untersuchungen wiesen darauf hin, dass auch Reelin, VLDLR und ApoER2 LTP und Gedächtnisbildung beeinflussen (Beffert et al., 2005; Larson et al., 2003; Weeber et al., 2002). Daher ist es auch denkbar, dass Reelin durch SRF-vermittelte Induktion von IEGs auf Lern- und Gedächtnisprozesse im Hippocampus Einfluss nimmt.

Zuletzt wurde auch *in vitro* eine funktionelle Interaktion zwischen Reelin und SRF untersucht. Anhand des Neuritenwachstums-Assays wurde deutlich, dass Reelin und SRF gemeinsam Einfluss auf das Zytoskelett ausüben. Sowohl Reelin-defiziente als auch SRF-defiziente Kulturen wiesen reduziertes Wachstum und Verzweigen von Neuriten auf (**Abb. 6 und 7**). SRF-VP16 konnte in Reelin-defizienten Kulturen die durchschnittliche wildtypische Neuritenlänge wieder herstellen (**Abb. 7**), was darauf hindeutet, dass SRF Reelin-induziertes Neuritenwachstum vermittelt. Damit übereinstimmend war Reelin aber in SRF-defizienten Kulturen nicht in der Lage, Neuritenwachstum zu stimulieren (**Abb. 6**), was eventuell darauf hinweist, dass wiederum Reelin auf SRF-vermittelte neuronale Motilität wirkt. Allerdings bleibt bei letzterem Versuch zu berücksichtigen, dass in SRF-defizienten Neuronen - bereits unabhängig von Reelin - schwere Störungen in der Zytoskelettdynamik vorliegen. SRF-defiziente Kulturen würden daher wahrscheinlich auf jegliche Art von externem Stimulus aufgrund der bereits vorhandenen Störungen in der Zytoskelettdynamik, keine Veränderung aufzeigen, so dass der Nachweis einer SRF-vermittelten Reaktion des Zytoskeletts durch einen bestimmten Stimulus, in SRF-defizienten Kulturen schwer nachzuweisen ist.

Anhand des aktinschneidenden Proteins Cofilin wurde jedoch auch deutlich, dass Reelin und SRF auch unterschiedlich auf die Aktivität von zytoskeletalen Proteinen wirken können. In *Srf* Mutanten treten erhöhte Mengen an phosphoryliertem und dadurch inaktivem Cofilin auf (Alberti et al., 2005), was darauf hindeutet, dass im Wildtyp SRF die Dephosphorylierung und damit Aktivierung von Cofilin vermittelt. In *Reeler* Mutanten ist dagegen die Phosphorylierung von Cofilin reduziert (Chai et al., 2009), was dafür spricht, dass im Wildtyp Reelin die Phosphorylierung und damit Inaktivierung von Cofilin herbeiführt.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass sowohl Reelin als auch SRF die Dynamik des Aktinzytoskeletts beeinflussen und dadurch verschiedene Prozesse in der Gehirnentwicklung steuern. Dabei bestehen die Möglichkeiten, dass Reelin und SRF in einem gemeinsamen Signalweg fungieren, aber auch (wie an Cofilin gezeigt) in separaten Wegen wirken können. Im Allgemeinen ließ sich außerdem feststellen, dass in den von uns verwendeten *Srf* Mutanten die hippocampalen Veränderungen,

z.B. die Körnerzelldispersion und der axonale Lenkungsdefekt der C/A-Fasern, im Vergleich zur *Reeler* Maus weniger stark ausgeprägt waren, und die Defekte im DG von *Srf* Mutanten mehr den *ApoER2*^{-/-} und *Vldlr*^{-/-} Einzelmutanten ähnelten. Daher ist es wahrscheinlich, dass die Aktivierung von SRF durch Reelin nur einer von vielen möglichen Signalwegen darstellt, wie Reelin seine Funktion während der hippocampalen Entwicklung ausüben kann.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden neue Funktionen des *Serum Response Factors* (SRF) beim Aufbau neuronaler Netzwerke entdeckt:

Im **Manuskript 1 (Stritt et al., 2009)** wurde die Transkription von Genen auf genomweiter Ebene im Gehirn von wildtypischen und SRF-defizienten Mäusen verglichen. Durch die Analyse der *GeneChip*-Daten ging hervor, dass myelin- und oligodendrocytenspezifische Gene in den *Srf* Mutanten drastisch herunterreguliert waren. Hieraus vermutete Defekte in der axonalen Myelinisierung und in der Oligodendrocytendifferenzierung konnten *in vivo* und *in vitro* in den *Srf* Mutanten bzw. in SRF-defizienten Zellkulturen bestätigt werden. Damit wurde eine völlig neue Rolle von SRF als Regulator der Myelinisierung und Oligodendrocytendifferenzierung aufgedeckt. Durch weitere Untersuchungen wurde das *insulin growth factor binding protein* CTGF (*connective tissue growth factor*) im Gehirn als SRF-reguliertes Signalmolekül identifiziert, das von Neuronen sekretiert wird. Unsere Ergebnisse ergaben zusammenfassend, dass neuronales SRF über CTGF auf parakrine Weise die Myelinisierung und Oligodendrocytendifferenzierung beeinflussen kann, indem CTGF auf die Insulinsignalgebung wirkt und die fördernde Wirkung von *insulin growth factors* (IGFs) auf die Myelinisierung antagonisiert.

Im **Manuskript 2 (Stern et al., 2009)** der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Aktin nicht nur die Funktion als Bestandteil des zytoplasmatischen Zellgerüsts ausübt, sondern dass Aktin-Signalgebung in Neuronen aktiv an SRF-vermittelter Genexpression beteiligt ist, wodurch neuronale Motilität moduliert wird.

Im **Manuskript 3 (Stritt and Knöll, 2009)** dieser Arbeit wurden neue Funktionen von SRF in der hippocampalen Entwicklung identifiziert. Histologische Untersuchungen ergaben, dass SRF im Hippocampus Aufbau von Zell- und Faserschichten, Dendritenwachstum und die Bildung dendritischer Dornfortsätze reguliert. Da die in den *Srf* Mutanten beobachteten Defekte in der hippocampalen Entwicklung stark an Mutanten des Reelin-Signalweges erinnerten, wurde außerdem eine mögliche

Interaktion zwischen SRF und Reelin analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass SRF den Ort der Reelin-Signalgebung beeinflusst, da in *Srf* Mutanten Reelin-exprimierende Zellen ektopisch lokalisiert waren. Des Weiteren konnte eine durch Reelin induzierte Signalkaskade in SRF-vermittelter Transkription resultieren. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass Reelin und SRF gemeinsam Neuritenwachstum regulieren, wobei SRF eventuell als Mediator von Reelin-induziertem Neuritenwachstum fungiert.

6 Summary

In the present study we could identify new functions of the *Serum Response Factor* (SRF) during the development of neuronal networks:

Within **manuscript 1 (Stritt et al., 2009)** we compare gene expression on a genome-wide level between brains of wildtype and SRF-deficient mice. Analysis of the *GeneChips* revealed that genes, associated with myelination and differentiation of oligodendrocytes, were strongly downregulated in *Srf* mutants. We therefore concluded that axonal myelination and oligodendrocyte differentiation might be affected in *Srf* mutants. Indeed, we could *in vivo* and *in vitro* observe severe defects in myelination and oligodendrocyte differentiation, both, in *Srf* mutants, as well as in SRF-deficient cultures. Thus, we uncovered a new role of SRF in regulating myelination and oligodendrocyte differentiation during brain development. We identified CTGF (*connective tissue growth factor*) - an insulin growth factor binding protein, that can be secreted by neurons - to be regulated by SRF. Altogether, our results showed, that neuronal SRF can regulate myelination and oligodendrocyte differentiation in a paracrine manner, by transcriptionally regulating *Ctgf*, whose gene product can affect Insulin signaling and can counteract IGF1 (insulin growth factor1)-stimulated oligodendrocyte differentiation.

In **manuscript 2 (Stern et al., 2009)** of the present work we could show, that actin not only functions in neurons as a part of the cytoskeleton, but is also actively functioning as a signal mediator, involved in SRF-dependent gene expression, that leads to neuronal motility.

In **manuscript 3 (Stritt and Knöll, 2009)** of this work we identified new functions of SRF in hippocampal development. Immunohistological studies revealed that SRF regulates hippocampal lamination, dendritic branching and dendritic spine number. As these phenotypes observed in *Srf* mutants resemble mice lacking components of the Reelin signaling cascade, we analysed a potential interaction between SRF and Reelin signaling. In support of such an interaction, our data indicate that SRF

influences location of Reelin-expressing cells. We also observed that Reelin can activate SRF-dependent gene transcription.

Additionally, we could show that Reelin and SRF act together in regulating neurite outgrowth, with SRF being a mediator of Reelin-induced neurite outgrowth.

7 Referenzen

Alberti, S., Krause, S.M., Kretz, O., Philippar, U., Lemberger, T., Casanova, E., Wiebel, F.F., Schwarz, H., Frotscher, M., Schutz, G., *et al.* (2005). Neuronal migration in the murine rostral migratory stream requires serum response factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 6148-6153.

Angstenberger, M., Wegener, J.W., Pichler, B.J., Judenhofer, M.S., Feil, S., Alberti, S., Feil, R., and Nordheim, A. (2007). Severe intestinal obstruction on induced smooth muscle-specific ablation of the transcription factor SRF in adult mice. *Gastroenterology* 133, 1948-1959.

Arnaud, L., Ballif, B.A., Forster, E., and Cooper, J.A. (2003). Fyn tyrosine kinase is a critical regulator of disabled-1 during brain development. *Curr Biol* 13, 9-17.

Arsenian, S., Weinhold, B., Oelgeschlager, M., Ruther, U., and Nordheim, A. (1998). Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis. *Embo J* 17, 6289-6299.

Assadi, A.H., Zhang, G., Beffert, U., McNeil, R.S., Renfro, A.L., Niu, S., Quattrocchi, C.C., Antalffy, B.A., Sheldon, M., Armstrong, D.D., *et al.* (2003). Interaction of reelin signaling and Lis1 in brain development. *Nat Genet* 35, 270-276.

Ballif, B.A., Arnaud, L., Arthur, W.T., Guris, D., Imamoto, A., and Cooper, J.A. (2004). Activation of a Dab1/CrkL/C3G/Rap1 pathway in Reelin-stimulated neurons. *Curr Biol* 14, 606-610.

Baron, W., Colognato, H., and French-Constant, C. (2005). Integrin-growth factor interactions as regulators of oligodendroglial development and function. *Glia* 49, 467-479.

Barres, B.A., Lazar, M.A., and Raff, M.C. (1994). A novel role for thyroid hormone, glucocorticoids and retinoic acid in timing oligodendrocyte development. *Development* 120, 1097-1108.

Barres, B.A., and Raff, M.C. (1999). Axonal control of oligodendrocyte development. *J Cell Biol* 147, 1123-1128.

Baumann, N., and Pham-Dinh, D. (2001). Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 81, 871-927.

Beffert, U., Weeber, E.J., Durudas, A., Qiu, S., Masiulis, I., Sweatt, J.D., Li, W.P., Adelman, G., Frotscher, M., Hammer, R.E., *et al.* (2005). Modulation of synaptic plasticity and memory by Reelin involves differential splicing of the lipoprotein receptor Apoer2. *Neuron* 47, 567-579.

Beffert, U., Weeber, E.J., Morfini, G., Ko, J., Brady, S.T., Tsai, L.H., Sweatt, J.D., and Herz, J. (2004). Reelin and cyclin-dependent kinase 5-dependent signals cooperate

- in regulating neuronal migration and synaptic transmission. *J Neurosci* 24, 1897-1906.
- Belaguli, N.S., Sepulveda, J.L., Nigam, V., Charron, F., Nemer, M., and Schwartz, R.J. (2000). Cardiac tissue enriched factors serum response factor and GATA-4 are mutual coregulators. *Mol Cell Biol* 20, 7550-7558.
- Bock, H.H., and Herz, J. (2003). Reelin activates SRC family tyrosine kinases in neurons. *Curr Biol* 13, 18-26.
- Bourne, J.N., and Harris, K.M. (2008). Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu Rev Neurosci* 31, 47-67.
- Buchwalter, G., Gross, C., and Wasylyk, B. (2004). Ets ternary complex transcription factors. *Gene* 324, 1-14.
- Cahill, M.A., Janknecht, R., and Nordheim, A. (1996). Signalling pathways: jack of all cascades. *Curr Biol* 6, 16-19.
- Cahoy, J.D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L.C., Zamanian, J.L., Christopherson, K.S., Xing, Y., Lubischer, J.L., Krieg, P.A., Krupenko, S.A., *et al.* (2008). A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci* 28, 264-278.
- Canoll, P.D., Musacchio, J.M., Hardy, R., Reynolds, R., Marchionni, M.A., and Salzer, J.L. (1996). GGF/neuregulin is a neuronal signal that promotes the proliferation and survival and inhibits the differentiation of oligodendrocyte progenitors. *Neuron* 17, 229-243.
- Casanova, E., Fehsenfeld, S., Mantamadiotis, T., Lemberger, T., Greiner, E., Stewart, A.F., and Schutz, G. (2001). A CamKIIalpha iCre BAC allows brain-specific gene inactivation. *Genesis* 31, 37-42.
- Caviness, V.S., Jr. (1982). Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: a developmental study based upon [3H]thymidine autoradiography. *Brain Res* 256, 293-302.
- Chai, J., Jones, M.K., and Tarnawski, A.S. (2004). Serum response factor is a critical requirement for VEGF signaling in endothelial cells and VEGF-induced angiogenesis. *FASEB J* 18, 1264-1266.
- Chai, X., Forster, E., Zhao, S., Bock, H.H., and Frotscher, M. (2009). Reelin stabilizes the actin cytoskeleton of neuronal processes by inducing n-cofilin phosphorylation at serine3. *J Neurosci* 29, 288-299.
- Chang, P.S., Li, L., McAnally, J., and Olson, E.N. (2001). Muscle specificity encoded by specific serum response factor-binding sites. *J Biol Chem* 276, 17206-17212.
- Chaqour, B., and Goppelt-Struebe, M. (2006). Mechanical regulation of the Cyr61/CCN1 and CTGF/CCN2 proteins. *Febs J* 273, 3639-3649.
- Charvet, C., Houbron, C., Parlakian, A., Giordani, J., Lahoute, C., Bertrand, A., Sotiropoulos, A., Renou, L., Schmitt, A., Melki, J., *et al.* (2006). New role for serum

response factor in postnatal skeletal muscle growth and regeneration via the interleukin 4 and insulin-like growth factor 1 pathways. *Mol Cell Biol* 26, 6664-6674.

Chen, C.Y., and Schwartz, R.J. (1996). Recruitment of the tinman homolog Nkx-2.5 by serum response factor activates cardiac alpha-actin gene transcription. *Mol Cell Biol* 16, 6372-6384.

Chen, F., Kook, H., Milewski, R., Gitler, A.D., Lu, M.M., Li, J., Nazarian, R., Schnepf, R., Jen, K., Biben, C., *et al.* (2002). Hop is an unusual homeobox gene that modulates cardiac development. *Cell* 110, 713-723.

Chesik, D., De Keyser, J., and Wilczak, N. (2008). Insulin-like growth factor system regulates oligodendroglial cell behavior: therapeutic potential in CNS. *J Mol Neurosci* 35, 81-90.

Cooper, S.J., Trinklein, N.D., Nguyen, L., and Myers, R.M. (2007). Serum response factor binding sites differ in three human cell types. *Genome Res* 17, 136-144.

Curran, T., and D'Arcangelo, G. (1998). Role of reelin in the control of brain development. *Brain Res Brain Res Rev* 26, 285-294.

D'Arcangelo, G., Homayouni, R., Keshvara, L., Rice, D.S., Sheldon, M., and Curran, T. (1999). Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron* 24, 471-479.

D'Arcangelo, G., Miao, G.G., Chen, S.C., Soares, H.D., Morgan, J.I., and Curran, T. (1995). A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature* 374, 719-723.

Deller, T., Drakew, A., and Frotscher, M. (1999a). Different primary target cells are important for fiber lamination in the fascia dentata: a lesson from reeler mutant mice. *Exp Neurol* 156, 239-253.

Deller, T., Drakew, A., Heimrich, B., Forster, E., Tielsch, A., and Frotscher, M. (1999b). The hippocampus of the reeler mutant mouse: fiber segregation in area CA1 depends on the position of the postsynaptic target cells. *Exp Neurol* 156, 254-267.

Demerens, C., Stankoff, B., Logak, M., Anglade, P., Allinquant, B., Couraud, F., Zalc, B., and Lubetzki, C. (1996). Induction of myelination in the central nervous system by electrical activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9887-9892.

Dillon, C., and Goda, Y. (2005). The actin cytoskeleton: integrating form and function at the synapse. *Annu Rev Neurosci* 28, 25-55.

Dubois-Dalcq, M., Behar, T., Hudson, L., and Lazzarini, R.A. (1986). Emergence of three myelin proteins in oligodendrocytes cultured without neurons. *J Cell Biol* 102, 384-392.

Dulabon, L., Olson, E.C., Taglienti, M.G., Eisenhuth, S., McGrath, B., Walsh, C.A., Kreidberg, J.A., and Anton, E.S. (2000). Reelin binds alpha3beta1 integrin and inhibits neuronal migration. *Neuron* 27, 33-44.

Engert, F., and Bonhoeffer, T. (1999). Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 399, 66-70.

- Ernst, W.H., Janknecht, R., Cahill, M.A., and Nordheim, A. (1995). Transcriptional repression mediated by the serum response factor. *FEBS Lett* 357, 45-49.
- Etkin, A., Alarcon, J.M., Weisberg, S.P., Touzani, K., Huang, Y.Y., Nordheim, A., and Kandel, E.R. (2006). A Role in Learning for SRF: Deletion in the Adult Forebrain Disrupts LTD and the Formation of an Immediate Memory of a Novel Context. *Neuron* 50, 127-143.
- Falconer, D.S. (1951). Two new mutants 'trembler' and 'reeler' with neurological actions in the house mouse. *JGenetics* 50, 192-201.
- Feng, G., Mellor, R.H., Bernstein, M., Keller-Peck, C., Nguyen, Q.T., Wallace, M., Nerbonne, J.M., Lichtman, J.W., and Sanes, J.R. (2000). Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* 28, 41-51.
- Feng, Y., and Walsh, C.A. (2004). The many faces of filamin: a versatile molecular scaffold for cell motility and signalling. *Nat Cell Biol* 6, 1034-1038.
- Fernandez, P.A., Tang, D.G., Cheng, L., Prochiantz, A., Mudge, A.W., and Raff, M.C. (2000). Evidence that axon-derived neuregulin promotes oligodendrocyte survival in the developing rat optic nerve. *Neuron* 28, 81-90.
- Fischer, M., Kaech, S., Knutti, D., and Matus, A. (1998). Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron* 20, 847-854.
- Forster, E., Tielsch, A., Saum, B., Weiss, K.H., Johanssen, C., Graus-Porta, D., Muller, U., and Frotscher, M. (2002). Reelin, Disabled 1, and beta 1 integrins are required for the formation of the radial glial scaffold in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13178-13183.
- Forster, E., Zhao, S., and Frotscher, M. (2006). Laminating the hippocampus. *Nat Rev Neurosci* 7, 259-267.
- Franco, C.A., Mericskay, M., Parlakian, A., Gary-Bobo, G., Gao-Li, J., Paulin, D., Gustafsson, E., and Li, Z. (2008). Serum response factor is required for sprouting angiogenesis and vascular integrity. *Dev Cell* 15, 448-461.
- Frotscher, M. (1998). Cajal-Retzius cells, Reelin, and the formation of layers. *Curr Opin Neurobiol* 8, 570-575.
- Frotscher, M., Haas, C.A., and Forster, E. (2003). Reelin controls granule cell migration in the dentate gyrus by acting on the radial glial scaffold. *Cereb Cortex* 13, 634-640.
- Gebhardt, C., Del Turco, D., Drakew, A., Tielsch, A., Herz, J., Frotscher, M., and Deller, T. (2002). Abnormal positioning of granule cells alters afferent fiber distribution in the mouse fascia dentata: morphologic evidence from reeler, apolipoprotein E receptor 2-, and very low density lipoprotein receptor knockout mice. *J Comp Neurol* 445, 278-292.
- Gilmore, E.C., and Herrup, K. (2000). Cortical development: receiving reelin. *Curr Biol* 10, R162-166.

- Goto, K., Kurihara, T., Takahashi, Y., and Kondo, H. (1990). Expression of genes for the myelin-specific proteins in oligodendrocytes in vivo demands the presence of axons. *Neurosci Lett* 117, 269-274.
- Govek, E.E., Newey, S.E., and Van Aelst, L. (2005). The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev* 19, 1-49.
- Grummt, I. (2006). Actin and myosin as transcription factors. *Curr Opin Genet Dev* 16, 191-196.
- Guan, K.L., and Rao, Y. (2003). Signalling mechanisms mediating neuronal responses to guidance cues. *Nat Rev Neurosci* 4, 941-956.
- Haas, C.A., Dudeck, O., Kirsch, M., Huszka, C., Kann, G., Pollak, S., Zentner, J., and Frotscher, M. (2002). Role for reelin in the development of granule cell dispersion in temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 22, 5797-5802.
- Hashimoto-Torii, K., Torii, M., Sarkisian, M.R., Bartley, C.M., Shen, J., Radtke, F., Gridley, T., Sestan, N., and Rakic, P. (2008). Interaction between Reelin and Notch signaling regulates neuronal migration in the cerebral cortex. *Neuron* 60, 273-284.
- Hauser, S.L., and Oksenberg, J.R. (2006). The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron* 52, 61-76.
- Hautmann, M.B., Madsen, C.S., Mack, C.P., and Owens, G.K. (1998). Substitution of the degenerate smooth muscle (SM) alpha-actin CC(A/T-rich)6GG elements with c-fos serum response elements results in increased basal expression but relaxed SM cell specificity and reduced angiotensin II inducibility. *J Biol Chem* 273, 8398-8406.
- He, L., and Hannon, G.J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 5, 522-531.
- Heuer, H., Christ, S., Friedrichsen, S., Brauer, D., Winckler, M., Bauer, K., and Raivich, G. (2003). Connective tissue growth factor: a novel marker of layer VII neurons in the rat cerebral cortex. *Neuroscience* 119, 43-52.
- Hiesberger, T., Trommsdorff, M., Howell, B.W., Goffinet, A., Mumby, M.C., Cooper, J.A., and Herz, J. (1999). Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron* 24, 481-489.
- Holtz, M.L., and Misra, R.P. (2008). Endothelial-specific ablation of serum response factor causes hemorrhaging, yolk sac vascular failure, and embryonic lethality. *BMC Dev Biol* 8, 65.
- Howell, B.W., Hawkes, R., Soriano, P., and Cooper, J.A. (1997). Neuronal position in the developing brain is regulated by mouse disabled-1. *Nature* 389, 733-737.
- Howell, B.W., Herrick, T.M., and Cooper, J.A. (1999). Reelin-induced tyrosine [corrected] phosphorylation of disabled 1 during neuronal positioning. *Genes Dev* 13, 643-648.

- Hsieh, J., Aimone, J.B., Kaspar, B.K., Kuwabara, T., Nakashima, K., and Gage, F.H. (2004). IGF-I instructs multipotent adult neural progenitor cells to become oligodendrocytes. *J Cell Biol* 164, 111-122.
- Jessen, K.R., and Mirsky, R. (2005). The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci* 6, 671-682.
- Johnson, C.M., Hill, C.S., Chawla, S., Treisman, R., and Bading, H. (1997). Calcium controls gene expression via three distinct pathways that can function independently of the Ras/mitogen-activated protein kinases (ERKs) signaling cascade. *J Neurosci* 17, 6189-6202.
- Jones, M.W., Errington, M.L., French, P.J., Fine, A., Bliss, T.V., Garel, S., Charnay, P., Bozon, B., Laroche, S., and Davis, S. (2001). A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. *Nat Neurosci* 4, 289-296.
- Kalita, K., Kharebava, G., Zheng, J.J., and Hetman, M. (2006). Role of megakaryoblastic acute leukemia-1 in ERK1/2-dependent stimulation of serum response factor-driven transcription by BDNF or increased synaptic activity. *J Neurosci* 26, 10020-10032.
- Katsuyama, Y., and Terashima, T. (2009). Developmental anatomy of reeler mutant mouse. *Dev Growth Differ* 51, 271-286.
- Kim, H.S., Nagalla, S.R., Oh, Y., Wilson, E., Roberts, C.T., Jr., and Rosenfeld, R.G. (1997). Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12981-12986.
- Knoll, B., Kretz, O., Fiedler, C., Alberti, S., Schutz, G., Frotscher, M., and Nordheim, A. (2006). Serum response factor controls neuronal circuit assembly in the hippocampus. *Nat Neurosci* 9, 195-204.
- Knoll, B., and Nordheim, A. (2009). Functional versatility of transcription factors in the nervous system: the SRF paradigm. *Trends Neurosci*; accepted for publication.
- Kook, H., Lepore, J.J., Gitler, A.D., Lu, M.M., Wing-Man Yung, W., Mackay, J., Zhou, R., Ferrari, V., Gruber, P., and Epstein, J.A. (2003). Cardiac hypertrophy and histone deacetylase-dependent transcriptional repression mediated by the atypical homeodomain protein Hop. *J Clin Invest* 112, 863-871.
- Kuhl, N.M., Hoekstra, D., De Vries, H., and De Keyser, J. (2003). Insulin-like growth factor-binding protein 6 inhibits survival and differentiation of rat oligodendrocyte precursor cells. *Glia* 44, 91-101.
- Lappe-Siefke, C., Goebbels, S., Gravel, M., Nicksch, E., Lee, J., Braun, P.E., Griffiths, I.R., and Nave, K.A. (2003). Disruption of *Cnp1* uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nat Genet* 33, 366-374.
- Larson, J., Hoffman, J.S., Guidotti, A., and Costa, E. (2003). Olfactory discrimination learning deficit in heterozygous reeler mice. *Brain Res* 971, 40-46.

- Latasa, M.U., Couton, D., Charvet, C., Lafanechere, A., Guidotti, J.E., Li, Z., Tuil, D., Daegelen, D., Mitchell, C., and Gilgenkrantz, H. (2007). Delayed liver regeneration in mice lacking liver serum response factor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292, G996-G1001.
- Leask, A., and Abraham, D.J. (2006). All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker. *J Cell Sci* 119, 4803-4810.
- Lee, J.L., Everitt, B.J., and Thomas, K.L. (2004). Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science* 304, 839-843.
- Li, S., Czubyrt, M.P., McAnally, J., Bassel-Duby, R., Richardson, J.A., Wiebel, F.F., Nordheim, A., and Olson, E.N. (2005). Requirement for serum response factor for skeletal muscle growth and maturation revealed by tissue-specific gene deletion in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1082-1087.
- Lippman, J., and Dunaevsky, A. (2005). Dendritic spine morphogenesis and plasticity. *J Neurobiol* 64, 47-57.
- Lonze, B.E., and Ginty, D.D. (2002). Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35, 605-623.
- Macklin, W.B., Weill, C.L., and Deininger, P.L. (1986). Expression of myelin proteolipid and basic protein mRNAs in cultured cells. *J Neurosci Res* 16, 203-217.
- MacLaurin, S.A., Krucker, T., and Fish, K.N. (2007). Hippocampal dendritic arbor growth in vitro: regulation by Reelin-Disabled-1 signaling. *Brain Res* 1172, 1-9.
- Maletic-Savatic, M., Malinow, R., and Svoboda, K. (1999). Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science* 283, 1923-1927.
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G.C., and Kasai, H. (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429, 761-766.
- McDonald, D., Carrero, G., Andrin, C., de Vries, G., and Hendzel, M.J. (2006). Nucleoplasmic beta-actin exists in a dynamic equilibrium between low-mobility polymeric species and rapidly diffusing populations. *J Cell Biol* 172, 541-552.
- McMorris, F.A., Smith, T.M., DeSalvo, S., and Furlanetto, R.W. (1986). Insulin-like growth factor I/somatomedin C: a potent inducer of oligodendrocyte development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 822-826.
- Mericskay, M., Blanc, J., Tritsch, E., Moriez, R., Aubert, P., Neunlist, M., Feil, R., and Li, Z. (2007). Inducible mouse model of chronic intestinal pseudo-obstruction by smooth muscle-specific inactivation of the SRF gene. *Gastroenterology* 133, 1960-1970.
- Miano, J.M., Long, X., and Fujiwara, K. (2007). Serum response factor: master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C70-81.

- Miano, J.M., Ramanan, N., Georger, M.A., de Mesy Bentley, K.L., Emerson, R.L., Balza, R.O., Jr., Xiao, Q., Weiler, H., Ginty, D.D., and Misra, R.P. (2004). Restricted inactivation of serum response factor to the cardiovascular system. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 17132-17137.
- Miller, R.H. (2002). Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS. *Prog Neurobiol* *67*, 451-467.
- Minty, A., and Kedes, L. (1986). Upstream regions of the human cardiac actin gene that modulate its transcription in muscle cells: presence of an evolutionarily conserved repeated motif. *Mol Cell Biol* *6*, 2125-2136.
- Miralles, F., Hebrard, S., Lamotte, L., Durel, B., Gilgenkrantz, H., Li, Z., Daegelen, D., Tuil, D., and Joshi, R.L. (2006). Conditional inactivation of the murine serum response factor in the pancreas leads to severe pancreatitis. *Lab Invest* *86*, 1020-1036.
- Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A.I., and Treisman, R. (2003). Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* *113*, 329-342.
- Miranti, C.K., Ginty, D.D., Huang, G., Chatila, T., and Greenberg, M.E. (1995). Calcium activates serum response factor-dependent transcription by a Ras- and Elk-1-independent mechanism that involves a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase. *Mol Cell Biol* *15*, 3672-3684.
- Mirsky, R., Winter, J., Abney, E.R., Pruss, R.M., Gavrilovic, J., and Raff, M.C. (1980). Myelin-specific proteins and glycolipids in rat Schwann cells and oligodendrocytes in culture. *J Cell Biol* *84*, 483-494.
- Misra, R.P., Bonni, A., Miranti, C.K., Rivera, V.M., Sheng, M., and Greenberg, M.E. (1994). L-type voltage-sensitive calcium channel activation stimulates gene expression by a serum response factor-dependent pathway. *J Biol Chem* *269*, 25483-25493.
- Muehlich, S., Wang, R., Lee, S.M., Lewis, T.C., Dai, C., and Prywes, R. (2008). Serum-induced phosphorylation of the serum response factor coactivator MKL1 by the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway inhibits its nuclear localization. *Mol Cell Biol* *28*, 6302-6313.
- Nave, K.A., and Trapp, B.D. (2008). Axon-glia signaling and the glial support of axon function. *Annu Rev Neurosci* *31*, 535-561.
- Nicolay, D.J., Doucette, J.R., and Nazarali, A.J. (2007). Transcriptional control of oligodendrogenesis. *Glia* *55*, 1287-1299.
- Niu, S., Renfro, A., Quattrocchi, C.C., Sheldon, M., and D'Arcangelo, G. (2004). Reelin promotes hippocampal dendrite development through the VLDLR/ApoER2-Dab1 pathway. *Neuron* *41*, 71-84.
- Niu, S., Yabut, O., and D'Arcangelo, G. (2008). The Reelin signaling pathway promotes dendritic spine development in hippocampal neurons. *J Neurosci* *28*, 10339-10348.

- Niu, Z., Li, A., Zhang, S.X., and Schwartz, R.J. (2007). Serum response factor micromanaging cardiogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 19, 618-627.
- Norman, C., Runswick, M., Pollock, R., and Treisman, R. (1988). Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element. *Cell* 55, 989-1003.
- Nosten-Bertrand, M., Kappeler, C., Dinocourt, C., Denis, C., Germain, J., Phan Dinh Tuy, F., Verstraeten, S., Alvarez, C., Metin, C., Chelly, J., *et al.* (2008). Epilepsy in *Dcx* knockout mice associated with discrete lamination defects and enhanced excitability in the hippocampus. *PLoS One* 3, e2473.
- Ogawa, M., Miyata, T., Nakajima, K., Yagyu, K., Seike, M., Ikenaka, K., Yamamoto, H., and Mikoshiba, K. (1995). The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. *Neuron* 14, 899-912.
- Park, S.K., Miller, R., Krane, I., and Vartanian, T. (2001). The *erbB2* gene is required for the development of terminally differentiated spinal cord oligodendrocytes. *J Cell Biol* 154, 1245-1258.
- Parlakian, A., Charvet, C., Escoubet, B., Mericskay, M., Molkentin, J.D., Gary-Bobo, G., De Windt, L.J., Ludosky, M.A., Paulin, D., Daegelen, D., *et al.* (2005). Temporally controlled onset of dilated cardiomyopathy through disruption of the SRF gene in adult heart. *Circulation* 112, 2930-2939.
- Parlakian, A., Tuil, D., Hamard, G., Tavernier, G., Hentzen, D., Concordet, J.P., Paulin, D., Li, Z., and Daegelen, D. (2004). Targeted inactivation of serum response factor in the developing heart results in myocardial defects and embryonic lethality. *Mol Cell Biol* 24, 5281-5289.
- Pearlman, A.L., and Sheppard, A.M. (1996). Extracellular matrix in early cortical development. *Prog Brain Res* 108, 117-134.
- Perbal, B. (2004). CCN proteins: multifunctional signalling regulators. *Lancet* 363, 62-64.
- Philimonenko, V.V., Zhao, J., Iben, S., Dingova, H., Kysela, K., Kahle, M., Zentgraf, H., Hofmann, W.A., de Lanerolle, P., Hozak, P., *et al.* (2004). Nuclear actin and myosin I are required for RNA polymerase I transcription. *Nat Cell Biol* 6, 1165-1172.
- Philippar, U., Schrott, G., Dieterich, C., Muller, J.M., Galgoczy, P., Engel, F.B., Keating, M.T., Gertler, F., Schule, R., Vingron, M., *et al.* (2004). The SRF target gene *Fhl2* antagonizes RhoA/MAL-dependent activation of SRF. *Mol Cell* 16, 867-880.
- Pipes, G.C., Creemers, E.E., and Olson, E.N. (2006). The myocardin family of transcriptional coactivators: versatile regulators of cell growth, migration, and myogenesis. *Genes Dev* 20, 1545-1556.
- Popowicz, G.M., Schleicher, M., Noegel, A.A., and Holak, T.A. (2006). Filamins: promiscuous organizers of the cytoskeleton. *Trends Biochem Sci* 31, 411-419.

- Posern, G., Miralles, F., Guettler, S., and Treisman, R. (2004). Mutant actins that stabilise F-actin use distinct mechanisms to activate the SRF coactivator MAL. *Embo J* 23, 3973-3983.
- Posern, G., Sotiropoulos, A., and Treisman, R. (2002). Mutant actins demonstrate a role for unpolymerized actin in control of transcription by serum response factor. *Mol Biol Cell* 13, 4167-4178.
- Posern, G., and Treisman, R. (2006). Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction. *Trends Cell Biol* 16, 588-596.
- Ramanan, N., Shen, Y., Sarsfield, S., Lemberger, T., Schutz, G., Linden, D.J., and Ginty, D.D. (2005). SRF mediates activity-induced gene expression and synaptic plasticity but not neuronal viability. *Nat Neurosci* 8, 759-767.
- Rice, D.S., and Curran, T. (1999). Mutant mice with scrambled brains: understanding the signaling pathways that control cell positioning in the CNS. *Genes Dev* 13, 2758-2773.
- Rice, D.S., and Curran, T. (2001). Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annu Rev Neurosci* 24, 1005-1039.
- Scherer, S.S., Vogelbacker, H.H., and Kamholz, J. (1992). Axons modulate the expression of proteolipid protein in the CNS. *J Neurosci Res* 32, 138-148.
- Schmidt, A., and Hall, A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* 16, 1587-1609.
- Schratt, G., Philippar, U., Berger, J., Schwarz, H., Heidenreich, O., and Nordheim, A. (2002). Serum response factor is crucial for actin cytoskeletal organization and focal adhesion assembly in embryonic stem cells. *J Cell Biol* 156, 737-750.
- Schratt, G., Weinhold, B., Lundberg, A.S., Schuck, S., Berger, J., Schwarz, H., Weinberg, R.A., Ruther, U., and Nordheim, A. (2001). Serum response factor is required for immediate-early gene activation yet is dispensable for proliferation of embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 21, 2933-2943.
- Segal, M. (2002). Changing views of Cajal's neuron: the case of the dendritic spine. *Prog Brain Res* 136, 101-107.
- Sepulveda, J.L., Vlahopoulos, S., Iyer, D., Belaguli, N., and Schwartz, R.J. (2002). Combinatorial expression of GATA4, Nkx2-5, and serum response factor directs early cardiac gene activity. *J Biol Chem* 277, 25775-25782.
- Settleman, J. (2003). A nuclear MAL-function links Rho to SRF. *Mol Cell* 11, 1121-1123.
- Sheldon, M., Rice, D.S., D'Arcangelo, G., Yoneshima, H., Nakajima, K., Mikoshiba, K., Howell, B.W., Cooper, J.A., Goldowitz, D., and Curran, T. (1997). Scrambler and yotari disrupt the disabled gene and produce a reeler-like phenotype in mice. *Nature* 389, 730-733.

- Shin, C.H., Liu, Z.P., Passier, R., Zhang, C.L., Wang, D.Z., Harris, T.M., Yamagishi, H., Richardson, J.A., Childs, G., and Olson, E.N. (2002). Modulation of cardiac growth and development by HOP, an unusual homeodomain protein. *Cell* 110, 725-735.
- Shore, P., and Sharrocks, A.D. (1995). The MADS-box family of transcription factors. *Eur J Biochem* 229, 1-13.
- Sibbe, M., Forster, E., Basak, O., Taylor, V., and Frotscher, M. (2009). Reelin and Notch1 cooperate in the development of the dentate gyrus. *J Neurosci* 29, 8578-8585.
- Simo, S., Pujadas, L., Segura, M.F., La Torre, A., Del Rio, J.A., Urena, J.M., Comella, J.X., and Soriano, E. (2007). Reelin induces the detachment of postnatal subventricular zone cells and the expression of the Egr-1 through Erk1/2 activation. *Cereb Cortex* 17, 294-303.
- Simons, M., and Trajkovic, K. (2006). Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. *J Cell Sci* 119, 4381-4389.
- Spruston, N. (2008). Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nat Rev Neurosci* 9, 206-221.
- Stanfield, B.B., and Cowan, W.M. (1979). The morphology of the hippocampus and dentate gyrus in normal and reeler mice. *J Comp Neurol* 185, 393-422.
- Stangel, M., and Hartung, H.P. (2002). Remyelinating strategies for the treatment of multiple sclerosis. *Prog Neurobiol* 68, 361-376.
- Stern, S., Debre, E., Stritt, C., Berger, J., Posern, G., and Knoll, B. (2009). A nuclear actin function regulates neuronal motility by serum response factor-dependent gene transcription. *J Neurosci* 29, 4512-4518.
- Stringer, J.L., Belaguli, N.S., Iyer, D., Schwartz, R.J., and Balasubramanyam, A. (2002). Developmental expression of serum response factor in the rat central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 138, 81-86.
- Stritt, C., Stern, S., Harting, K., Manke, T., Sinske, D., Schwarz, H., Vingron, M., Nordheim, A., and Knoll, B. (2009). Paracrine control of oligodendrocyte differentiation by SRF-directed neuronal gene expression. *Nat Neurosci* 12, 418-427.
- Sun, K., Battle, M.A., Misra, R.P., and Duncan, S.A. (2009). Hepatocyte expression of serum response factor is essential for liver function, hepatocyte proliferation and survival, and postnatal body growth in mice. *Hepatology* 49, 1645-1654.
- Sun, Q., Chen, G., Streb, J.W., Long, X., Yang, Y., Stoeckert, C.J., Jr., and Miano, J.M. (2006). Defining the mammalian CArGome. *Genome Res* 16, 197-207.
- Tabuchi, A., Estevez, M., Henderson, J.A., Marx, R., Shiota, J., Nakano, H., and Baraban, J.M. (2005). Nuclear translocation of the SRF co-activator MAL in cortical neurons: role of RhoA signalling. *J Neurochem* 94, 169-180.

- Tedeschi, A., and Di Giovanni, S. (2009). The non-apoptotic role of p53 in neuronal biology: enlightening the dark side of the moon. *EMBO Rep* 10, 576-583.
- Treisman, R. (1986). Identification of a protein-binding site that mediates transcriptional response of the c-fos gene to serum factors. *Cell* 46, 567-574.
- Trommsdorff, M., Gotthardt, M., Hiesberger, T., Shelton, J., Stockinger, W., Nimpf, J., Hammer, R.E., Richardson, J.A., and Herz, J. (1999). Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell* 97, 689-701.
- Vartiainen, M.K. (2008). Nuclear actin dynamics--from form to function. *FEBS Lett* 582, 2033-2040.
- Vartiainen, M.K., Guettler, S., Larijani, B., and Treisman, R. (2007). Nuclear actin regulates dynamic subcellular localization and activity of the SRF cofactor MAL. *Science* 316, 1749-1752.
- Wang, D., Chang, P.S., Wang, Z., Sutherland, L., Richardson, J.A., Small, E., Krieg, P.A., and Olson, E.N. (2001). Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell* 105, 851-862.
- Wang, D.Z., Li, S., Hockemeyer, D., Sutherland, L., Wang, Z., Schrott, G., Richardson, J.A., Nordheim, A., and Olson, E.N. (2002). Potentiation of serum response factor activity by a family of myocardin-related transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14855-14860.
- Wang, S., Sdrulla, A.D., diSibio, G., Bush, G., Nofziger, D., Hicks, C., Weinmaster, G., and Barres, B.A. (1998). Notch receptor activation inhibits oligodendrocyte differentiation. *Neuron* 21, 63-75.
- Wang, Z., Wang, D.Z., Hockemeyer, D., McAnally, J., Nordheim, A., and Olson, E.N. (2004). Myocardin and ternary complex factors compete for SRF to control smooth muscle gene expression. *Nature* 428, 185-189.
- Ware, M.L., Fox, J.W., Gonzalez, J.L., Davis, N.M., Lambert de Rouvroit, C., Russo, C.J., Chua, S.C., Jr., Goffinet, A.M., and Walsh, C.A. (1997). Aberrant splicing of a mouse disabled homolog, mdab1, in the scrambler mouse. *Neuron* 19, 239-249.
- Weeber, E.J., Beffert, U., Jones, C., Christian, J.M., Forster, E., Sweatt, J.D., and Herz, J. (2002). Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning. *J Biol Chem* 277, 39944-39952.
- Wenzel, H.J., Robbins, C.A., Tsai, L.H., and Schwartzkroin, P.A. (2001). Abnormal morphological and functional organization of the hippocampus in a p35 mutant model of cortical dysplasia associated with spontaneous seizures. *J Neurosci* 21, 983-998.
- Wickramasinghe, S.R., Alvania, R.S., Ramanan, N., Wood, J.N., Mandai, K., and Ginty, D.D. (2008). Serum Response Factor Mediates NGF-Dependent Target Innervation by Embryonic DRG Sensory Neurons. *Neuron* 58, 532-545.

- Wiebel, F.F., Rennekampff, V., Vintersten, K., and Nordheim, A. (2002). Generation of mice carrying conditional knockout alleles for the transcription factor SRF. *Genesis* 32, 124-126.
- Yang, S.H., Bumpass, D.C., Perkins, N.D., and Sharrocks, A.D. (2002). The ETS domain transcription factor Elk-1 contains a novel class of repression domain. *Mol Cell Biol* 22, 5036-5046.
- Ye, P., Carson, J., and D'Ercole, A.J. (1995). In vivo actions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on brain myelination: studies of IGF-I and IGF binding protein-1 (IGFBP-1) transgenic mice. *J Neurosci* 15, 7344-7356.
- Yuste, R., and Bonhoeffer, T. (2001). Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 24, 1071-1089.
- Yuste, R., and Bonhoeffer, T. (2004). Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nat Rev Neurosci* 5, 24-34.
- Zhang, S.X., Garcia-Gras, E., Wycuff, D.R., Marriot, S.J., Kadeer, N., Yu, W., Olson, E.N., Garry, D.J., Parmacek, M.S., and Schwartz, R.J. (2005). Identification of direct serum-response factor gene targets during Me2SO-induced P19 cardiac cell differentiation. *J Biol Chem* 280, 19115-19126.
- Zhao, S., Chai, X., Forster, E., and Frotscher, M. (2004). Reelin is a positional signal for the lamination of dentate granule cells. *Development* 131, 5117-5125.
- Zhou, Q., Homma, K.J., and Poo, M.M. (2004). Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron* 44, 749-757.
- Zinck, R., Hipskind, R.A., Pingoud, V., and Nordheim, A. (1993). c-fos transcriptional activation and repression correlate temporally with the phosphorylation status of TCF. *EMBO J* 12, 2377-2387.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
α ...	anti...
<i>Acta2</i>	<i>actin, alpha 2</i>
<i>Actb</i>	<i>actin, beta</i>
<i>Actg</i>	<i>actin, gamma</i>
ApoER2	Apolipoprotein E Rezeptor 2
APP	Amyloid Vorläuferprotein (<i>amyloid precursor protein</i>)
<i>Arc</i>	<i>activity regulated cytoskeletal-associated protein</i>
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
C/A-Fasern	kommissural assoziative Fasern
CaMKII	Ca^{2+} / <i>Calmodulin-dependent kinase II</i>
CA-Region	<u>C</u> ornu <u>A</u> mmonis, Ammonshorn
<i>Cdk5</i>	<i>cyclin-dependent kinase 5</i>
cDNA/cRNA	komplementäre DNA/RNA
<i>c-Fos</i>	<i>cellular FBJ osteosarcoma oncogene</i>
<i>Cldn11</i>	<i>Claudin11</i>
CNP	<i>2'3'-cyclic nucleotide 3'phosphodiesterase</i>
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRE	<i>cyclization recombination</i>
CREB	<i>cAMP responsive element binding protein</i>
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
Ct-Wert	Schwellenwert (<i>cycle threshold</i>)
<i>Cyr61</i>	<i>cysteine-rich, angiogenic inducer, 61</i>
DAB	Diaminobenzidin
Dab-1	<i>disabled-1</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DG	Gyrus dentatus

DNA	Desoxyribonucleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
E17.5	Embryonaler Tag 17.5
EC-Fasern	Fasern des entorhinalen Cortex
<i>Egr-1</i>	<i>early growth response gene-1</i>
Elk-1	<i>Ets-like transcription factor</i>
EphA4	<i>Eph receptor A4</i>
EphA7	<i>Eph receptor A7</i>
<i>ErbB</i>	<i>v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog</i>
Ergänz. Abb.	Ergänzungsabbildung
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
EtOH	Ethanol
Ets	<i>E-twenty-six</i>
F-Aktin	filamentöses Aktin
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FGF-2	<i>fibroblast growth factor 2</i>
FHL2	<i>four-and-a-half Lim domain protein 2</i>
<i>Flna</i>	Filamin α
<i>FosB</i>	<i>FBJ osteosarcoma oncogene B</i>
fw	<i>forward</i>
<i>Fyn</i>	<i>proto-oncogene tyrosine-protein kinase fyn</i>
G-Aktin	globuläres Aktin
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	<i>guanosine biphosphate</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
<i>Gsn</i>	Gelsolin
GST	<u>G</u> lutathion- <u>S</u> - <u>T</u> ransferase
GTP	<i>guanosine triphosphate</i>
h	Stunde (n)
HDACs	Histon-Deacetylasen
HEK293	<i>human embryonic kidney 293 cells</i>
Hes5	<i>hairy and enhancer of split 5</i>
HOP	<i>homeodomain-only protein</i>

IEGs	<i>immediate early genes</i>
IGF	<i>insulin growth factors</i>
IGFBP	<i>insulin growth factor binding protein</i>
IL-4	<i>interleukin 4</i>
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i>
kg	Kilogramm
LB-Medium	<i>lysogeny broth - Medium</i>
LIM	<i>Lin11, Isl-1 and Mec-3</i>
LIM Kinase	<i>LIM domain kinase</i>
<i>Lis-1</i>	<i>lissencephaly-1</i>
loxP-Elemente	<i>locus of crossing over</i>
LTD	<i>long term depression</i>
LTP	<i>long term potentiation</i>
MADS	<i>MCM1, Agamous, Deficiens, serum response factor</i>
MAG	<i>Myelin-Associated Glycoprotein</i>
MAL/MKL1	<i>megakaryoblastic leukemia 1</i>
<i>Map2</i>	<i>microtubule-associated protein 2</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MBP	<i>Myelin Basic Protein</i>
mDia	<i>mammalian Diaphanous-related formins</i>
mg	Milligramm
min	Minuten
MKL2	<i>megakaryoblastic leukemia 2</i>
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MOG	<i>Myelin-Oligodendrocyte Glycoprotein</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRTF	<i>myocardin-related transcription factors</i>
ms	Millisekunde
MyoD	<i>myogenic differentiation 1</i>
Net	<i>new ets transcription factor</i>
NG2	<i>nerve/glial antigen 2</i>
NGS	<i>normal goat serum</i>
NLS	<i>nuclear location sequence</i>

nm	Nanometer
NT-3	<i>neurotrophin 3</i>
<i>Olig1, Olig2</i>	<i>oligodendrocyte transcription factor 1 and 2</i>
OPCs	<i>oligodendrocyte precursor cells</i>
P1	Postnataler Tag 1
p38/SAPK	<i>stress-activated protein kinase</i>
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (<i>Phosphat Buffered Saline</i>)
P-Cofilin	<i>Phosphoryliertes Cofilin</i>
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDGF-A	<i>platelet derived growth factor A</i>
PDGFR α	<i>platelet derived growth factor receptor α</i>
PFU	<i>plaque forming unit</i> ; Infektiöse Einheiten
PI	<i>Protease-Inhibitor</i>
PLL	Poly-L-Lysin
PLP	Proteolipid Protein
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rap-1	<i>RAS-related protein-1</i>
rel.	relativ
rev	<i>reverse</i>
RMS	<i>rostral migratory stream</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROCK	<i>Rho associated kinase</i> , Rho-assozierte Serin-Threonin-Kinase
RT-PCR	<i>Real Time - polymerase chain reaction</i>
SAP-1	<i>SRF accessory protein 1</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunden
Sema	Semaphorin
Smi32	<i>Neurofilament H Non-Phosphorylated</i>
Sox10	<i>SRY (sex determining region Y)-box 10</i>
Src	<i>Rous sarcoma oncogene</i>
SRE	<i>serum response element</i>

SRF	<i><u>s</u>erum <u>r</u>esponse <u>f</u>actor</i>
Str.o	<i>Stratum oriens</i>
Str.r	<i>Stratum radiatum</i>
TCF	<i><u>t</u>ernary <u>c</u>omplex <u>f</u>actor</i>
TGF β	<i><u>t</u>ransforming <u>g</u>rowth <u>f</u>actor β</i>
<i>Thy1</i>	<i>thymus cell antigen 1, theta</i>
<i>Tmem10</i>	<i>transmembrane protein 10</i>
<i>Tpm2</i>	<i>tropomyosin 2, beta</i>
ü.N.	<u>ü</u> ber <u>N</u> acht
<i>Ugt8a</i>	<i>UDP galactosyltransferase 8A</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Volt
v.a	vor allem
<i>Vcl</i>	<i>Vinculin</i>
VLDLR	<i><u>V</u>ery <u>L</u>ow <u>D</u>ensity <u>L</u>ipoprotein-Rezeptor</i>
VP16	<i><u>V</u>irales <u>P</u>rotein 16</i>
z.B	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
μ l	Microliter

9 Eigenanteil an den vorgelegten Manuskripten/ Publikationen

Manuskript 1:

Stritt, C.*, Stern, S.*, Harting, K.*, Manke, T., Sinske, D., Schwarz, H., Vingron, M., Nordheim, A., and Knöll, B. (2009). *Paracrine control of oligodendrocyte differentiation by SRF-directed neuronal gene expression. Nat Neuroscience* **12**, 418-27.

*) gleicher Beitrag

Abb. 1, Abb. 2, Abb. 6a-d, i, Abb. 7 (zusammen mit B. Knöll und Daniela Sinske), Ergänzt. Abb. 1a, Ergänzt. Abb. 2a-h, Ergänzt. Abb. 3, Ergänzt. Abb. 4, Ergänzt. Abb. 5a-i, Ergänzt. Abb. 6, Ergänzt. Tabelle 1 und 2.

Manuskript 2:

Stern, S., Debre, E., **Stritt, C.**, Berger, J., Posern, G., and Knöll, B. (2009). *A nuclear actin function regulates neuronal motility by serum response factor-dependent gene transcription. J Neurosci* **29**, 4512-8.

Allg. Voruntersuchungen zum Vergleich Wachstumskegel von Kontroll- und SRF-defizienten Neuronen, Ergänzt. Abb. 2

Manuskript 3:

Stritt, C. and Knöll, B.

Reelin signalling and SRF (Serum Response Factor) gene transcription synergise during hippocampal development. Submitted (Eingereicht) .

Alle Abbildungen, (Abb.5 und Ergänzt. Abb. 4 und 6 zusammen mit Daniela Sinske)

10 Manuskripte

Paracrine control of oligodendrocyte differentiation by SRF-directed neuronal gene expression

Christine Stritt^{1,5}, Sina Stern^{1,5}, Kai Harting^{1,5}, Thomas Manke², Daniela Sinske¹, Heinz Schwarz³, Martin Vingron², Alfred Nordheim⁴ & Bernd Knöll¹

In neurons, serum response factor (SRF)-directed transcription regulates migration, axon pathfinding and synapse function. We found that forebrain-specific, neuron-restricted SRF ablation in mice elevated oligodendrocyte precursors while inhibiting terminal oligodendrocyte differentiation. Myelin gene and protein expression were downregulated and we observed a lack of oligodendrocytes in mixed neuron/glia and oligodendrocyte-enriched cultures derived from *Srf*^{-/-} mutants. Ultrastructural inspection revealed myelination defects and axonal degeneration in *Srf*^{-/-} mutants. Consistent with our finding that neuronal SRF depletion impaired oligodendrocyte fate in a non-cell autonomous manner, neuron-restricted expression of constitutively active SRF-VP16 affected neighboring oligodendrocyte maturation. Genome-wide transcriptomics identified candidate genes for paracrine regulation of oligodendrocyte development, including connective tissue growth factor (CTGF), whose expression is repressed by SRF. Adenovirus-mediated CTGF expression *in vivo* revealed that CTGF blocks excessive oligodendrocyte differentiation. *In vitro*, CTGF-mediated inhibition of oligodendrocyte maturation involved sequestration and thereby counteraction of insulin growth factor 1-stimulated oligodendrocyte differentiation.

Functional neuronal networks require that neurons interact with oligodendrocytes, the myelin sheath-producing glia of the CNS¹. Oligodendrocyte differentiation from oligodendrocyte precursor cells (OPCs) follows a temporally and spatially well-orchestrated path, which can be traced by consecutive marker acquisition, starting with early markers such as 2', 3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase (CNPase) and galactocerebroside, which is a major myelin glycolipid produced by UDP galactosyltransferase 8A. Subsequently, mature differentiation markers are acquired, including the main myelin proteins myelin basic protein (MBP), proteolipid protein (PLP) and myelin-associated glycoprotein, followed by late myelin proteins such as myelin oligodendrocyte glycoprotein and myelin-associated oligodendrocytic basic protein¹.

Oligodendrocyte maturation is in part intrinsically programmed, as shown by cell-autonomous oligodendrocyte development in the absence of neurons². However, neuronal contact enhances myelin gene expression³. These data suggest that secreted or membrane-associated neuron-derived factors regulate oligodendrocyte differentiation. Some of these have been identified, including insulin growth factors (IGFs) and their antagonists, the insulin growth factor binding proteins (IGFBPs)³⁻⁵. These signals regulate gene activity to generate precisely adjusted amounts and compositions of myelin proteins. So far, many transcription factors have been shown to have important functions in oligodendrocytes^{6,7}. In contrast, there is lack of knowledge regarding the

transcription factors that control the neuron-derived signals that are involved in oligodendrocyte maturation.

We found that neuron-restricted SRF ablation interfered with oligodendrocyte development in a non-cell autonomous manner. SRF, a MADS box transcription factor, recognizes CArG boxes (CC(AT)₆GG) in promoters. SRF has been implicated in both gene activation⁸ and repression⁹⁻¹¹, depending on, for example, cell type-specific cofactors and repressors. SRF elicits the immediate early gene response, resulting in rapid and transient induction of, for example, *c-fos*, *Cyr61* and *Egr1*. Furthermore, SRF controls cytoskeletal genes (such as *Actb* and *Gsn*), which give SRF access to cytoskeletal regulation and in turn exert feedback on SRF activity⁸. Conditional *Srf* mouse mutagenesis using Cre recombinase driven by the *Camk2a* promoter, resulting in neuron-exclusive excision of a *loxP*-flanked *Srf* allele, reveals SRF functions in neuronal migration, axonal pathfinding and synaptic transmission¹²⁻¹⁶.

Genome-wide transcriptomics of *Srf*^{-/-}; *Camk2a-iCre* mutant forebrains revealed an unanticipated downregulation of a gene set that is associated with oligodendrocyte development. The number of mature oligodendrocytes was reduced in *Srf* mutants both *in vivo* and *in vitro*, whereas the amount of OPC markers that we detected was increased. We used transcriptomics to identify SRF-responsive genes and found *Ctgf*, whose expression is repressed by wild-type SRF. Using adenoviral CTGF delivery *in vivo*, which resulted in impaired oligodendrocyte development, we found that CTGF blocked excessive

¹Neuronal Gene Expression Laboratory, Eberhard Karls University Tübingen, Interfaculty Institute for Cell Biology, Department of Molecular Biology, Tübingen, Germany. ²Max Planck Institute for Molecular Genetics, Department of Computational Molecular Biology, Berlin, Germany. ³Max Planck Institute for Developmental Biology, Microscopy Unit, Tübingen, Germany. ⁴Molecular Organ Function Laboratory, Eberhard Karls University Tübingen, Interfaculty Institute for Cell Biology, Department of Molecular Biology, Tübingen, Germany. ⁵These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to B.K. (bernd.knoell@uni-tuebingen.de).

Received 28 October 2008; accepted 20 January 2009; published online 8 March 2009; doi:10.1038/nn.2280

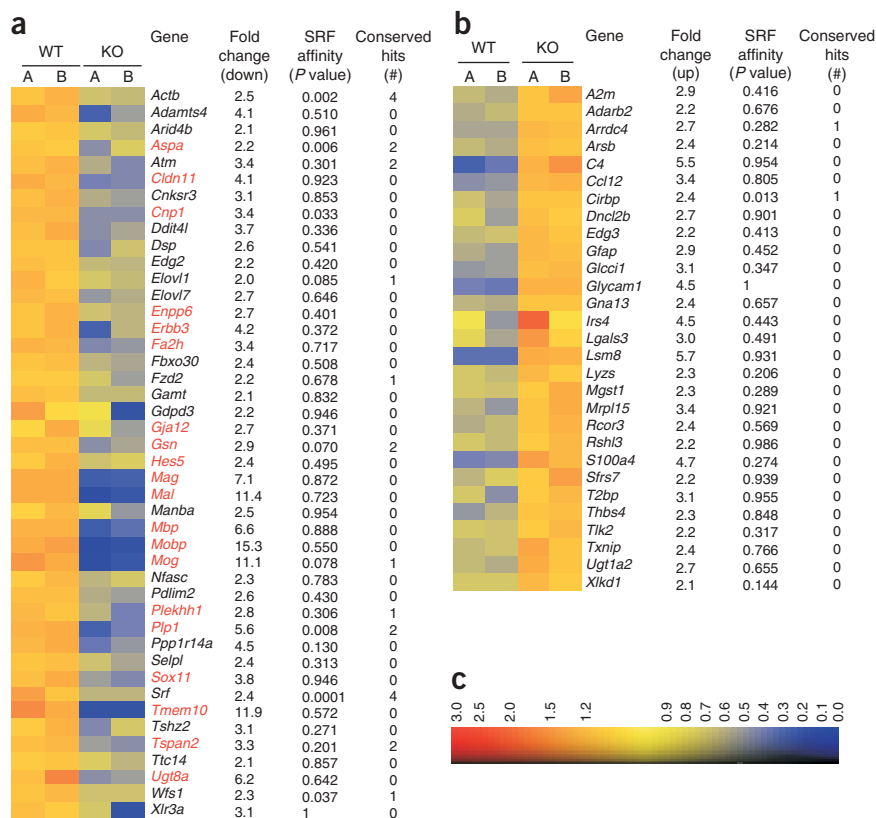


Figure 1 Genome-wide profiling of SRF target genes in the brain. We hybridized RNA prepared from P14 hippocampi of control and *Srf* mutant mice (each in doublet A, B) to Affymetrix GeneChips. Only genes with at least twofold change and a statistical significance of ≤ 0.05 are depicted. The relative SRF affinity (*P* value) to given CARG box sequences is indicated with the lowest values predicting highest affinity. In addition, the number of species-conserved SRF binding sites is listed (see also **Supplementary Table 1**). **(a)** Depicted are 44 transcripts that are downregulated in *Srf* mutants, with the respective fold change. Myelin structural genes or genes associated with myelin function are highlighted in red. KO, knockout; WT, wild type. **(b)** We found 29 transcripts that were upregulated in *Srf* mutants as compared with control. **(c)** The scale indicating the relative signal strength normalized to internal standards of the color-coded bars is shown. High expression levels are indicated by red colors, whereas blue colors represent lower expression levels.

tion. However, the astrocyte marker gene *Gfap* (glial fibrillary acidic protein) was upregulated.

To distinguish between direct and indirect SRF target genes, we ranked the affinity of SRF for each gene's promoter^{21,22} (lower values predict highest SRF affinity) and determined species-conserved SRF binding sites (**Fig. 1** and **Supplementary Table 1**). Indeed, SRF

target gene promoters (*Actb* and *Srf*) had the strongest SRF affinity. We validated myelin gene expression in independent RNA and protein samples from hippocampi ($n \geq 3$ mice, each genotype; **Supplementary Fig. 1** online) and cortices (data not shown), and found reduced expression of all major myelin structural genes following SRF ablation.

As ablation of SRF in the present mouse model is exclusive to neurons, downregulation of oligodendrocyte-specific transcripts indicates that a previously unknown non-cell autonomous regulation of oligodendrocyte development by neuronal SRF is occurring. To ascertain the exclusive nature of neuronal *Srf* deletion, we examined the expression of SRF and Cre recombinase driven by the *Camk2a* promoter. Consistent with previous reports^{12,13,15,23}, Cre recombinase was absent from white-matter areas (**Supplementary Fig. 2** online). *In vitro*, SRF levels decreased following Cre-mediated recombination in *Srf* mutant neurons but not in oligodendrocytes (**Supplementary Fig. 2**). Overall, our data argue that *Srf*^{-/-}; *Camk2a-iCre* mice are well suited to investigate the effect of impaired neuronal signaling on oligodendrocyte development caused by SRF deficiency.

SRF controls astrocyte number and axon integrity

To examine axon integrity and the surrounding myelin, we used immunohistochemistry in the corpus callosum and cortex ($n \geq 3$, each genotype; **Fig. 2**). MBP (**Fig. 2a,b**) and PLP (**Fig. 2c,d**) were reduced tenfold (10.6 ± 4.4 , $P < 0.0001$) and 2.5-fold (2.45 ± 0.9 , $P = 0.04$), respectively, in *Srf* mutants. Next, we analyzed OPC markers that either continued to be expressed in oligodendrocytes (OLIG1, OLIG2 and SOX10)^{7,19,24} or remained restricted to OPCs (NG2 and platelet-derived growth factor receptor α)^{1,24,25}. At P5, the expression of all OPC markers was elevated in *Srf* mutants (**Supplementary Fig. 3** online). At P16, OLIG1, OLIG2 and SOX10 expression were not altered, whereas PDGFR α (**Supplementary Fig. 4** online) and particularly NG2 (wild type, $10,500 \pm 7,700$ pixels in the NG2-positive

oligodendrocyte differentiation, which, to the best of our knowledge, is the first demonstration of a function for CTGF in the brain. *In vitro*, this CTGF-mediated block on oligodendrocyte maturation involved antagonizing IGF1-stimulated oligodendrocyte differentiation.

RESULTS

To unravel neuronal SRF functions, both us^{12,14} and other groups^{13,15} have established neuron-exclusive, forebrain-specific conditional *Srf* mouse mutants. The *Srf* mutants that we created suffer from weight loss and motor dysfunction, which results in death at around postnatal day 21 (P21)^{12,14}.

Myelin gene expression is impaired in *Srf* mutants

To identify genome-wide SRF target genes in the brain, we used GeneChip technology to examine RNA that was isolated from P14 hippocampi (**Fig. 1** and **Supplementary Table 1** and **Supplementary Methods** online). We found that 44 out of 39,000 transcripts were downregulated (**Fig. 1a**) and 29 were upregulated (**Fig. 1b**) in our *Srf* mutants^{12,14}, which were used throughout the study. The down-regulated genes included the well-known SRF target genes *Actb*, *Gsn* and *Srf*^{17,18}.

Notably, an entire gene group (20 out of 44) encoded myelin structural proteins or products that are associated with oligodendrocyte differentiation (**Fig. 1a**). In fact, 16 of these 20 were amongst the 40 genes that were most specific for oligodendrocytes¹⁹. In particular, structural myelin genes (*Plp1*, *Mbp*, *Mag*, *Mog*, *Mobp* and *Mal*) were the most affected by SRF deficiency. In addition, the expression of genes with established oligodendrocyte function (*Ugt8a*, *Cldn11* and *Hes5*) and of oligodendrocyte-enriched genes of unknown function (such as *Cnp*, *Tspan2*, *Tmem10* (also known as *Opalin*), *Aspa*, *Edg2* (also known as *Bud31*), *Fa2h* and *Plekhh1*) was impaired^{19,20}. The upregulated transcripts did not include genes with obvious oligodendrocyte annota-

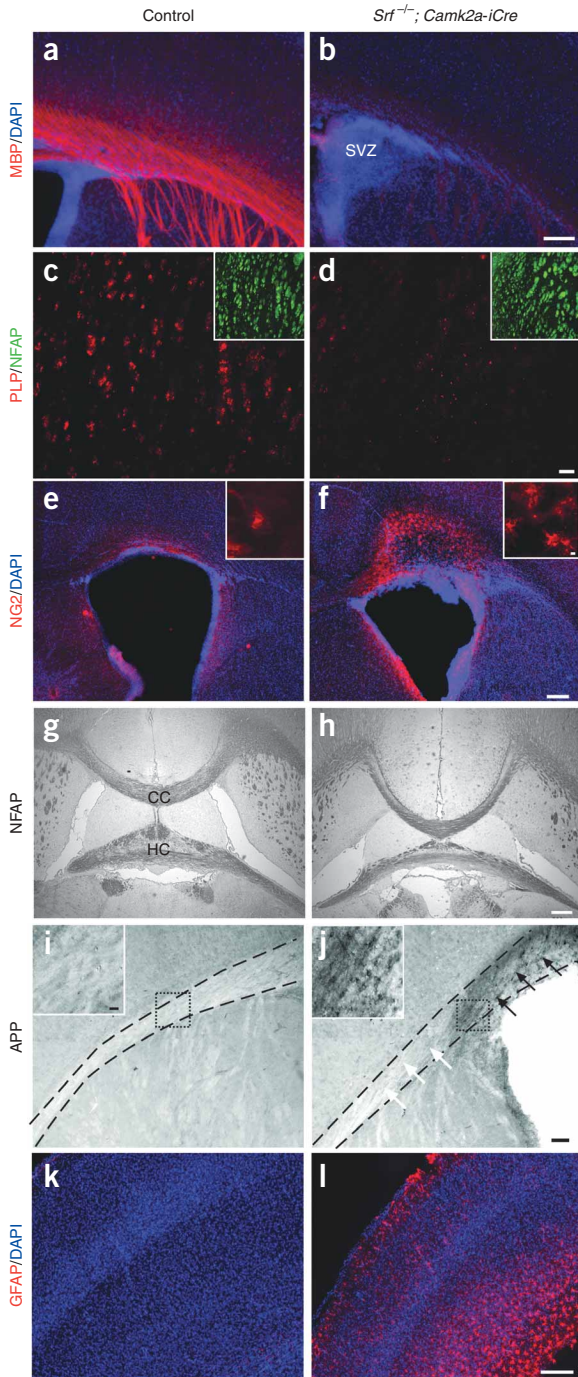


Figure 2 SRF depletion affects oligodendrocyte differentiation *in vivo*. (a,b) P14 control (a) and *Srf* mutant (b) forebrains were stained for MBP and DAPI. MBP expression in the corpus callosum was strongly reduced in *Srf* mutants. As previously reported¹², the SVZ, as shown by accumulation of DAPI-positive cells, was widened in *Srf* mutants. (c,d) PLP expression was markedly reduced in *Srf* mutants (d) compared with controls (c). The inserts indicate the presence of NFAP-positive axons. (e,f) At P16, NG2-positive OPCs were increased in *Srf* mutants (f) compared with controls (e). The inserts show NG2 staining of individual cells. (g,h) We used NFAP to label all axons. The diameters of the corpus callosum (CC) and hippocampal commissure (HC) were not altered between controls (g) and *Srf* mutants (h). (i,j) APP, a marker for axonal swellings, was induced in the P14 corpus callosum (dashed lines) of *Srf* mutants (j), but not in controls (i). Note that APP in *Srf* mutants (j) was more prominent in the corpus callosum next to the typically enlarged ventricle (black arrows) than in the neighboring corpus callosum region (white arrows). Inserts are higher magnifications of boxes showing APP-positive signals in mutants (j), but not control (i). (k,l) GFAP-positive astrocytes spread throughout almost all of the layers of the *Srf* mutant cortex (l), whereas only few cells were present in controls at P14 (k). Scale bars represent 200 μm (a,b,e-h,k,l), 50 μm (c,d) and 100 μm (i,j), and represent 5 μm (e,f) and 20 μm (i,j) in the inserts.

in wild-type mice, whereas a 100-fold increase was seen in *Srf* mutants (wild type, 3.6 ± 6.3 cells per 0.5 mm^2 ; *Srf*^{-/-}, 427.5 ± 159 cells per 0.5 mm^2 ; $P = 0.0023$; Fig. 2i,j). In addition, nonphosphorylated neurofilament levels, which are upregulated in many axonal pathologies (for example, see ref. 27), were increased in *Srf* mutants (Supplementary Fig. 5). We used periodic acid–Schiff staining, which visualizes carbohydrate-rich material, as an indirect marker for phagocytosing cells²⁶. The numbers of periodic acid–Schiff–positive deposits and microglia were elevated in *Srf* mutants (Supplementary Fig. 5).

Finally, we addressed astrocyte fate using GFAP and the recently identified pan-astrocyte marker Aldh1L1 (ref. 19). The amount of each marker that was present at P5 (Supplementary Fig. 3) and P16 (wild type, 12.2 ± 12 cells per 0.5 mm^2 ; *Srf*^{-/-}, 110 ± 9 cells per 0.5 mm^2 ; $P = 0.00037$; Fig. 2k,l and Supplementary Fig. 4) was elevated, indicating increased astrocyte numbers in *Srf* mutants.

We inspected myelination by electron microscopy. Because *Srf* mutants die at \sim P21, we were limited to a rather early time point and had to compare age-matched animals between P14–19 ($n = 5$, each genotype; Fig. 3). We focused on two corpus callosum positions: the corpus callosum dorsally to the striatum or the hippocampus. In controls (Fig. 3a,c), 50–60% of axons were myelinated (from a total of 3,202 and 1,124 axons for corpus callosum dorsally to the hippocampus and striatum, respectively), whereas myelination in *Srf* mutants was decreased to 10–20% (3,276 and 1,052 axons for corpus callosum dorsally to the hippocampus and striatum, respectively; Fig. 3b,d,g). Notably, large-diameter axons ($> 2 \mu\text{m}$) of *Srf* mutants more frequently lacked myelin than smaller axons (wild type, $66 \pm 10\%$ myelinated; *Srf*^{-/-}, $36 \pm 18\%$ myelinated; $P = 0.01$). In addition, we found no obvious alterations in periodicity and spacing between individual myelin layers (Fig. 3e,f). The g ratios (the ratio of the axon diameter to the combined diameter of the axone and myelin) of wild-type axons (0.93 ± 0.03) and the remaining myelinated axons in *Srf* mutants were comparable (0.92 ± 0.03 ; Fig. 3h). This suggests that it is the myelination onset that is affected in *Srf* mutants rather than the degree of myelination in remaining ensheathed axons. In sum, myelination in the *Srf* mutant corpus callosum was reduced.

SRF regulates oligodendrocyte numbers *in vitro*

To obtain mechanistic insight into SRF's role in oligodendrocyte maturation, we prepared oligodendrocyte-enriched cultures²⁸. We plated OPCs that were derived from control and *Srf* mutant mice

area; *Srf*^{-/-}, $86,000 \pm 29,000$; $P = 0.01$; Fig. 2e,f) remain upregulated in *Srf* mutants.

Neuronal SRF ablation impinges on axon formation¹⁴ and myelination defects might therefore be a result of axonal target deprivation. We stained for neurofilament-associated protein (NFAP; Fig. 2g,h) and β III-tubulin (Supplementary Fig. 5 online) expression and found no gross alteration in corpus callosum diameter (diameter for NFAP: wild type, $234 \pm 42 \mu\text{m}$; *Srf*^{-/-}, $208 \pm 50 \mu\text{m}$). We used markers that are associated with axonal pathologies to further assess axonal degeneration. Amyloid precursor protein (APP) accumulation is associated with disturbed axonal transport and results in axonal swellings and degeneration (for example, see ref. 26). Almost no APP was observed

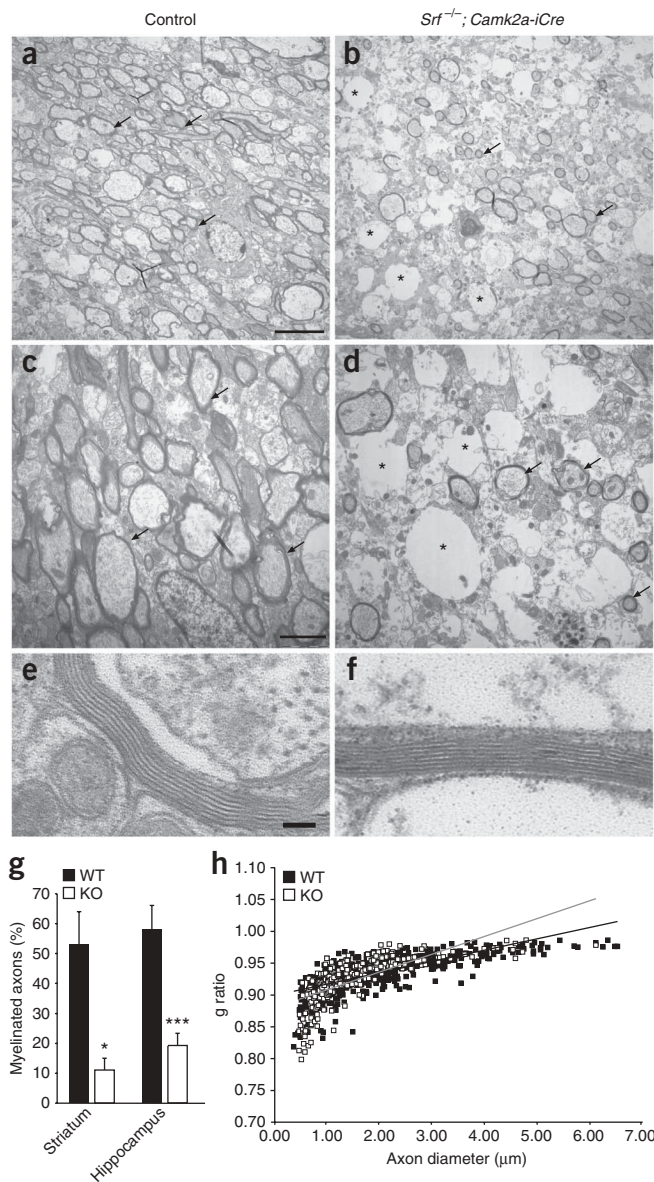


Figure 3 Electron-microscopic analysis of hypomyelination in the *Srf* mutant corpus callosum. (a–d) Low (a,b) and high (c,d) magnification views of ultra-thin sections derived from control (a,c) and *Srf* mutant (b,d) corpus callosum. In controls (a,c), the majority of axons were surrounded by myelin sheaths (arrows). In contrast, fewer axons were myelinated in *Srf* mutants (b,d), with large-caliber axons (asterisks) being more affected than smaller ones. (e,f) Images represent individual myelin sheaths of controls (e) and *Srf* mutants (f). With regard to periodicity and spacing, we did not observe obvious alterations in the remaining *Srf* mutant myelin. (g) Average percentage of myelinated axons in controls and *Srf* mutants. Independent specimens from anterior and posterior (dorsal to striatum and hippocampus, respectively) corpus callosum were evaluated. (h) g ratios of the control and remaining myelinated *Srf* mutant fibers were comparable. Error bars represent s.d. Scale bars represent 5 μm (a,b), 2 μm (c,d) and 75 nm (e,f). * $P \leq 0.05$ and *** $P \leq 0.001$.

membrane-associated neuronal factors that were induced by SRF deficiency and which were capable of preventing oligodendrocyte differentiation (for example, CTGF; see below). In addition, astrocyte numbers were elevated in *Srf* mutant oligodendrocyte-enriched cultures (Fig. 4h), and this increase might have contributed to the inhibition of oligodendrocyte maturation that we observed in *Srf* mutant oligodendrocyte-enriched culture.

We next employed hippocampal mixed cultures that largely conserved the numbers of and interactions taking place between neurons, oligodendrocytes and astrocytes (Fig. 5). After 5 and 12 DIV, we assessed the number of CNPase-, MBP- and OLIG2-positive cells in relation to the number of DAPI-positive cells ($n \geq 8$ mice for each condition and genotype). The number of OLIG2-positive cells was not substantially reduced by SRF deficiency (Fig. 5a,b,e). In contrast, the number of CNPase- and MBP-positive oligodendrocytes was decreased twofold after 5 DIV and fivefold after 12 DIV in *Srf* mutants (Fig. 5c–e). In addition, the control oligodendrocytes took up twice the area that the *Srf* mutant oligodendrocytes occupied (data not shown).

How are SRF-deficient neurons affecting oligodendrocytes? Because only neurons were SRF deficient in *Srf* mutant mixed cultures (Supplementary Fig. 2), the results that we obtained can be explained by a paracrine mechanism that involves either disturbed cell-cell communication and/or secretion of signaling molecule(s).

To test perturbed cell-cell communication, we cocultured wild-type cells (unlabeled) with labeled wild-type or *Srf* mutant cells in a 1:3 ratio to ensure extensive cell-cell contact. After 4 DIV, we quantified the effect of 4-(4-(dihexadecylamino)styryl)-*N*-methylpyridinium iodine (DiAsp)-labeled cells (wild type or mutant) on oligodendrocyte differentiation of wild-type, unlabeled cells. We found that the number of unlabeled, wild-type, CNPase-positive oligodendrocytes was reduced twofold when grown next to *Srf* mutant cells (Fig. 5f). These data indicate that molecules associated with *Srf* mutant cells are affecting wild-type oligodendrocyte differentiation.

To obtain further evidence for SRF regulating oligodendrocyte differentiation non-cell autonomously, we used a lentivirus²⁹ that drives SRF-VP16–IRES–green fluorescent protein (GFP) expression via the *Camk2a* promoter in neurons. SRF-VP16 is a constitutively active fusion protein of SRF and the viral protein VP16's transactivation domain, with the latter replacing the wild-type SRF transactivation domain. As a control, we used SRF-VP16ΔMADS–IRES–GFP, which partially lacks SRF's DNA binding domain. The constitutive transcriptional activator SRF-VP16 is highly useful for identifying SRF-regulated genes. Notably, SRF-VP16 is not subject to the endogenous control mechanisms that operate on wild-type SRF and therefore cannot provide insight as to whether such target genes are activated or repressed by wild-type SRF *in vivo* (see Discussion). SRF-VP16 expression in neurons affected neighboring oligodendrocytes *in vitro*.

($n \geq 15$ mice; each genotype) for 9 d *in vitro* (DIV) in differentiation medium (Fig. 4). Soon after plating, wild-type cells assembled in clusters (Fig. 4a), where they differentiated into CNPase-positive oligodendrocytes (Fig. 4e). In contrast, *Srf* mutant cells grew in isolation (Fig. 4b,d) and, although we initially plated an identical number of cells, essentially produced no oligodendrocytes (CNPase/DAPI ratio for wild type, 0.51 ± 0.22 s.e.m.; *Srf*^{−/−}, 0.008 ± 0.003 s.e.m.; $P = 0.044$; Fig. 4f). OLIG2-positive cells were not substantially reduced in *Srf* mutants (OLIG2/DAPI ratio for wild type, 0.24 ± 0.04 s.e.m.; *Srf*^{−/−}, 0.16 ± 0.03 s.e.m.; Fig. 4c–f). Notably, GFAP-positive astrocytes were increased fivefold in *Srf* mutants ($550 \pm 50\%$; $P = 0.037$; Fig. 4g,h). In light of a non-cell autonomous SRF function in oligodendrocyte development, the oligodendrocyte reduction in *Srf* mutant oligodendrocyte-enriched cultures might appear to be unexpected. However, even in *Srf* mutant oligodendrocyte-enriched cultures, OPCs were influenced for a considerable time by neurons lacking SRF (that is, *in vivo* until cortex dissection and *in vitro* for the first few days until neurons, initially part of the culture, had died). In this period of OPC–neuron interaction, OPCs may have encountered secreted or

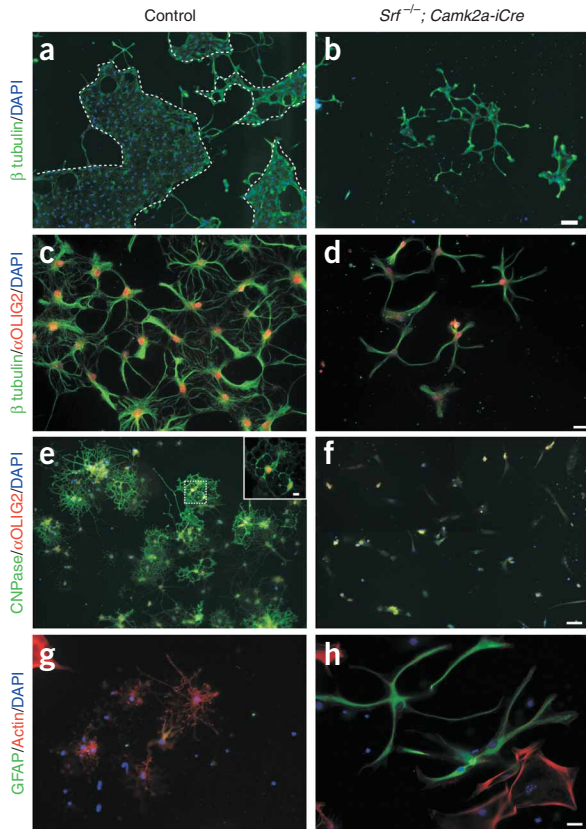


Figure 4 Absence of oligodendrocytes in *Srf* mutant oligodendrocyte-enriched cultures. (a–h) Control (a,c,e,g) and *Srf* mutant (b,d,f,h) OPCs were cultured in differentiation medium followed by immunocytochemistry. Low (a,b) and high (c,d) magnification views are shown of control (a,c) and *Srf* mutant (b,d) cultures stained for β III-tubulin (a–d) to visualize all cells and OLIG2 (c,d). Typically, control oligodendrocytes (a,c) assembled in clusters (dashed lines in a), whereas cells in *Srf* mutants (b) remained isolated from each other. DAPI intensity was reduced for better visualization of nuclear OLIG2 localization in c and d. Control (e) and *Srf* mutant (f) cultures were stained for CNPase and OLIG2. In contrast with controls (e), almost no CNPase-positive oligodendrocytes were present in *Srf* mutant cultures (f). The insert in e is a higher magnification of the dashed area, revealing nuclear OLIG2 staining. Increased numbers of GFAP-positive astrocytes were seen in *Srf* mutant (h) cultures compared with controls (g). Scale bars represent 100 μ m (a,b), 20 μ m (c,d,g,h) and 50 μ m (e,f), and 10 μ m in the insert.

example, *Acta1*, *Egr1* and *c-fos*, along with many previously unknown (neuron associated) putative SRF target genes (Supplementary Fig. 6 and Table 2 online). As mentioned before, SRF-VP16 is useful for examining the general responsiveness of genes toward SRF; however, it remains to be investigated separately whether a given target gene is activated or repressed by wild-type SRF.

Neuronal SRF target genes that are responsible for a paracrine role of SRF in oligodendrocyte development should be either secreted or membrane attached, their localization should be physiologically relevant to oligodendrocyte development and their basal expression should be altered between genotypes. CTGF fulfills all three of these criteria and we therefore examined whether it is indeed a SRF target gene that is potentially involved in oligodendrocyte maturation. CTGF, a CCN (CTGF/CYR61/NOV) family member, is a secreted factor that is associated with the extracellular matrix^{30–32}. *Ctgf* has been reported as being a SRF target gene outside of the brain^{17,18,33}.

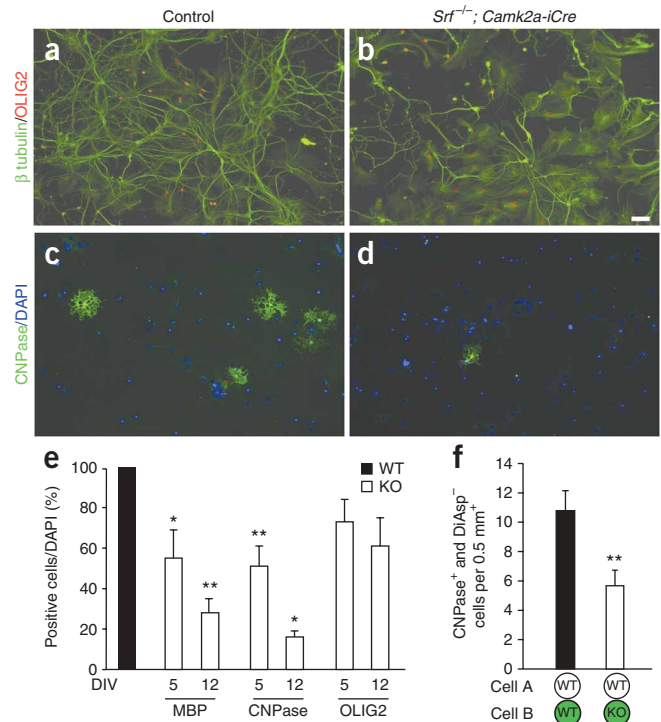
Ctgf expression was increased 10.6-fold by SRF-VP16 in our microarray (Supplementary Fig. 6), which we confirmed by quantitative PCR (data not shown). Basal *Ctgf* levels were altered between genotypes; *Ctgf* expression was increased in P14 *Srf* mutant forebrain (wild

In contrast with results obtained *in vivo* (Figs. 1–3 and Supplementary Fig. 1), SRF-VP16 suppressed oligodendrocyte maturation (SRF-VP16 Δ MADS, 0.09 ± 0.009 s.e.m. CNPase positive:DAPI ratio; SRF-VP16, 0.03 ± 0.01 s.e.m.; $n = 5$ experiments, $P = 0.039$). Similarly, electroporation of a *Srf-Vp16* expression vector resulted in a reduction in the number of CNPase-positive cells (SRF-VP16 Δ MADS, 0.19 ± 0.026 s.e.m. CNPase positive:DAPI ratio; SRF-VP16, 0.07 ± 0.007 s.e.m.; $n = 3$, $P = 0.0008$).

Ctgf is a SRF target gene that is relevant to myelination

SRF-VP16 might influence oligodendrocytes by regulating neuron-to-oligodendrocyte cell-cell contact and/or by providing a neuron-derived secreted factor that is recognized by oligodendrocytes. To obtain global insight into SRF-regulated neuronal genes, we carried out microarrays using wild-type cortical neurons that expressed SRF-VP16. These data confirmed that well-known target genes of SRF were upregulated (for

Figure 5 Loss of neuronal SRF affects oligodendrocyte number in mixed neuron/glia cultures. (a,b) Hippocampal cultures derived from control (a) and *Srf* mutant (b) brains were stained for β III-tubulin (green) to visualize the entire cell population. Staining for OLIG2 (red) revealed a slight reduction in the number of oligodendrocytes in *Srf* mutants (see e). (c,d) CNPase-labeled oligodendrocytes with well-elaborated protrusions in control cultures (c). CNPase-positive cells were decreased in number and area in *Srf* mutants (d), with longer culturing times being more severe (see e). (e) Quantification of MBP-, CNPase- and OLIG2-positive cells after 5 and 12 DIV, with control numbers set to 100%. We normalized to the number of DAPI-positive cells. (f) Coculturing *Srf* mutant, but not wild type (labeled green with DiAsp) cells with unlabeled wild-type cells decreased the number of CNPase-positive wild-type cells (expressed as ratio of DiAsp-negative, CNPase-positive cells:DAPI) compared with wild-type/wild-type cocultures. Error bars represent s.e.m. Scale bar represents 50 μ m. * $P \leq 0.05$ and ** $P \leq 0.01$.



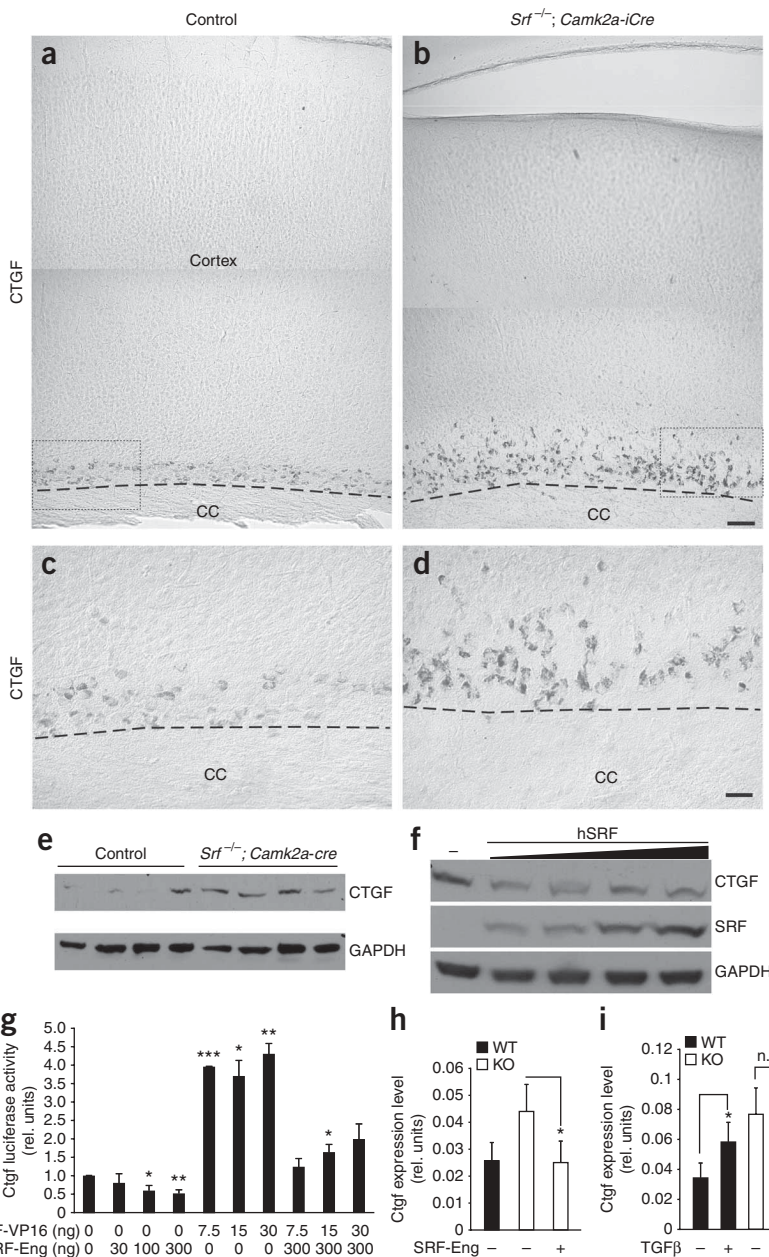


Figure 6 SRF represses CTGF *in vivo* and *in vitro*. (a–d) P14 brain sections of control (a,c) and *Srf* mutants (b,d) were stained for CTGF. In *Srf* mutants (b), we noted an increase in the numbers and dispersion of CTGF-positive cells dorsally to the corpus callosum compared with controls (a). (c,d) Higher magnifications of areas in boxes from a and b. Dashed lines mark the dorsal corpus callosum border. (e) CTGF levels in *Srf* mutants were higher in P14 brain lysates. (f) Overexpression of wild-type SRF suppressed CTGF levels compared with mock-transfected (–) SRF-deficient embryonic stem cells. (g) SRF fused to the engrailed repressor domain (SRF-Eng) reduced *Ctgf* reporter gene activity and counteracted SRF-VP16-mediated upregulation of *Ctgf* activity. (h) SRF-Eng repressed *Ctgf* levels in *Srf* mutant cortical neurons, resulting in *Ctgf* levels that were comparable to those of wild-type controls. (i) Stimulation of wild-type cortical cultures with TGFβ resulted in the induction of *Ctgf* RNA, in contrast with *Srf* mutant cultures. Note that in the absence of stimulation, *Ctgf* levels were higher in *Srf* mutants. Error bars represent s.d. Scale bars represent 50 μm (a,b) and 30 μm (c,d). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$. n.s., not significant ($P > 0.05$).

resulted in decreased CTGF expression levels (Fig. 6f). In addition, we constructed a fusion protein of SRF and the *D. melanogaster engrailed* repressor domain³⁶, which repressed *Ctgf* (and *c-fos*; data not shown) promoter activity and counteracted SRF-VP16-mediated *Ctgf* activation (Fig. 6g). SRF-engrailed-mediated repression was abolished by mutating the *c-fos* CARG box (data not shown). Furthermore, SRF-engrailed suppressed *Ctgf* expression in *Srf* mutant cortical neurons, resulting in *Ctgf* levels that were comparable to those of wild type ($n = 6$ mice; Fig. 6h). Next, we stimulated neurons with transforming growth factor β (TGFβ), a potent *Ctgf* inducer outside of the brain³⁰ and a physiologically relevant myelination modulator¹. In wild-type neurons, TGFβ stimulated *Ctgf* expression. This *Ctgf* activation was SRF dependent, as TGFβ failed to increase *Ctgf* expression in *Srf* mutant neurons ($n = 4$ experiments; Fig. 6i). Without stimulation, *Ctgf* in *Srf* mutants was elevated, which is consistent with SRF repressing *Ctgf* in a basal state (Fig. 6i and above).

Together, our data suggest that SRF operates as a *Ctgf* repressor in wild-type mice. These results superficially appear to be at odds with *Ctgf* stimulation by SRF-VP16, but it has to be taken into account that promoter occupation by the artificial and constitutively active transcriptional stimulator SRF-VP16 results in unrestrained transcriptional activation. In contrast, wild-type SRF, mediating either gene activation or repression, is subject to the stringent physiological regulation machinery that operates *in vivo*.

CTGF application interferes with myelination *in vivo*

So far, no function has been attributed to CTGF in the brain and *Ctgf* mutants die perinatally³⁷, precluding analysis on CNS oligodendrocyte

type, 0.005 ± 0.002 ; *Srf*^{-/-}, 0.014 ± 0.004 ; $P = 0.037$) and cortical cultures (wild type, 0.026 ± 0.005 ; *Srf*^{-/-}, 0.08 ± 0.037 ; $P = 0.045$, $n = 3$ mice; see below). Although CTGF was uniformly expressed in culture (data not shown), localization of CTGF is restricted to cortical layer VI *in vivo*³⁴, which we confirmed in control mice (Fig. 6). In *Srf* mutants, the number of CTGF-positive cells in this area was increased and the CTGF-positive cells were more dispersed (wild type, 110 ± 25 cells per 0.5 mm^2 ; *Srf*^{-/-}, 190 ± 12 ; $P = 0.0089$, $n = 3$; Fig. 6b,d). In addition, we found ectopic CTGF-positive cells in the striatum (data not shown) and upper cortical layers of *Srf* mutants (wild type, 1.3 ± 0.6 cells per 0.5 mm^2 ; *Srf*^{-/-}, 21 ± 1.5 ; $P < 0.0001$). CTGF was also upregulated in *Srf* mutant cortex protein lysates (Fig. 6e). These data suggest that SRF represses the *Ctgf* promoter.

Accordingly, in SRF-deficient embryonic stem cells³⁵, *Ctgf* promoter-driven luciferase activity was increased almost threefold compared with control (2.7 ± 0.4 , $P = 0.0026$, $n = 3$). In addition to our SRF loss-of-function data (Fig. 6a–e), SRF gain of function

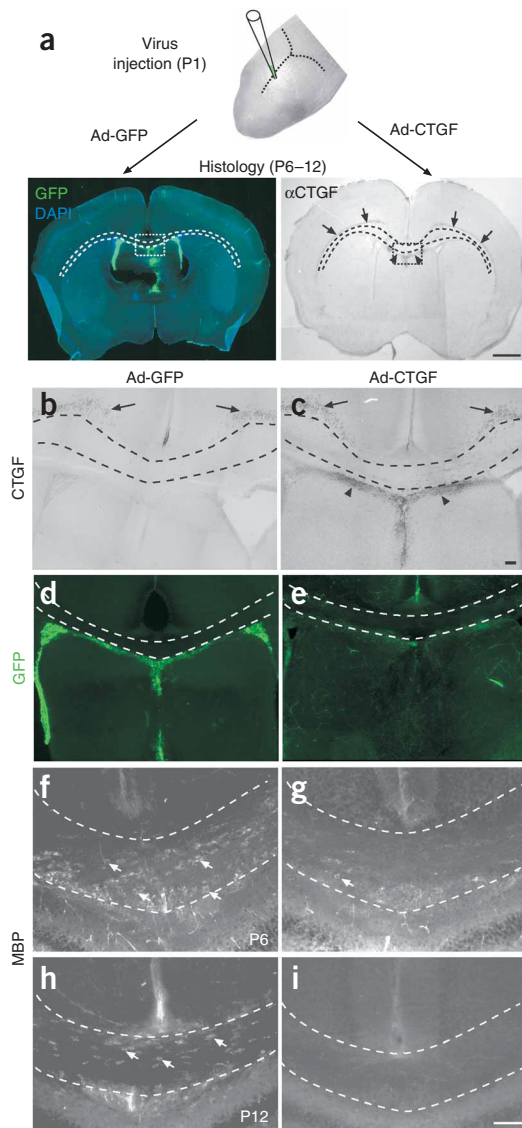


Figure 7 CTGF expression *in vivo* impairs oligodendrocyte development. (a) Experimental set-up for delivery of adenovirus expressing either GFP (control, Ad-GFP) or CTGF (Ad-CTGF). Top, head of a newborn mouse (P1) with approximate injection position relative to blood vessels (dotted lines). Bottom left, GFP distribution of an Ad-GFP-injected mouse on a P6 coronal brain section. Bottom right, distribution of endogenous (arrows) and exogenous (arrowheads) CTGF in an Ad-CTGF-injected mouse stained for CTGF expression at P6. The dashed boxes indicate the approximate position of the corpus callosum depicted in b-i. (b,c) We stained Ad-GFP- (b) or Ad-CTGF-injected (c) brains for CTGF expression at P6. Black arrows in b and c point to endogenous CTGF expression dorsally to the corpus callosum, whereas arrowheads point to exogenous, virally delivered CTGF expression (visible in c only; see also a). Notably, this ectopic CTGF expression typically formed a Y-shaped structure underneath the ventral corpus callosum border. (d,e) We visualized Ad-GFP- (d) or Ad-CTGF-injected (e) brains for GFP expression at P6. The pattern and number of GFP-positive cells of Ad-GFP-injected mice (d) were very similar to the CTGF distribution of Ad-CTGF-injected pups (compare with c). (f-i) Coronal sections of Ad-GFP- (f,h) or Ad-CTGF-injected (g,i) mice were stained for MBP at P6 (f,g) or P12 (h,i). The number of MBP-positive oligodendrocytes (arrows point to individual oligodendrocytes) in the corpus callosum was reduced in Ad-CTGF-injected mice (g,i) compared to controls (f,h). Dashed lines in a-i indicate the dorsal and ventral corpus callosum borders. Scale bars represent 1 mm (a) and 100 μm (b-i).

CTGF antagonizes IGF-mediated oligodendrocyte maturation

To examine the mechanism of CTGF-mediated oligodendrocyte inhibition (Fig. 7), we prepared oligodendrocyte-enriched cultures (Fig. 8a). In control cultures, oligodendrocytes gathered in clusters, whereas incubation with CTGF interfered with colony formation (control, 38.6 ± 4.5 s.e.m. colonies per 100 mm^2 ; CTGF, 13.8 ± 3.3 s.e.m.; $P = 0.0005$, $n = 4$ experiments). In addition, application of CTGF resulted in a concentration-dependent reduction in the number of oligodendrocytes in mixed neuronal/glial cultures but had no effect on astrocytes ($n = 4$ experiments; Fig. 8b and data not shown).

CTGF, also known as IGFBP8, contains an IGFBP domain binding to IGF1 (ref. 38). IGFs promote oligodendrocyte differentiation^{39,40}, whereas IGFBPs antagonize oligodendrocyte differentiation by sequestering IGFs^{41,42}. Accordingly, IGF1 alone increased oligodendrocyte numbers but did not affect astrocytes ($n = 4$; Fig. 8c,d). We then asked whether CTGF could use its IGFBP domain to counteract this IGF1-mediated stimulation of oligodendrocyte differentiation by controlling the amount of free IGF1 that is available to oligodendrocytes (Fig. 8c,e,f). Pre-incubation of IGF1 with CTGF antagonized IGF1-stimulated oligodendrocyte maturation by reducing oligodendrocyte number (Fig. 8e) and size ($n = 3$ experiments; Fig. 8f). Astrocytes were not affected, indicating that CTGF specifically influences oligodendrocytes (Fig. 8e).

Finally, we assessed the extent of CTGF's contribution to the decrease in the number of oligodendrocytes in *Srf* mutants by immunodepleting CTGF with antibodies to it (Fig. 8g). The addition of CTGF antibodies to wild-type culture medium had no effect, whereas the number of oligodendrocytes was substantially elevated in *Srf* mutants ($n = 4$ mice for wild type, 8 for *Srf*^{-/-}). These data indicate that increased CTGF levels are a major source of the inhibition of oligodendrocyte differentiation that we observed in *Srf* mutants *in vitro*.

SRF regulation of myelin gene expression

SRF was expressed in oligodendrocytes *in vivo* (although weaker than in neurons; Supplementary Fig. 2). *Srf*^{-/-}; *Camk2a-iCre* mice provide data indicating that there is non-cell autonomous regulation of oligodendrocyte differentiation by neuronal SRF. This does not exclude an additional SRF function in myelin gene expression in oligodendrocytes.

development. The potential of SRF to repress *Ctgf* (Fig. 6) suggests that elevated CTGF expression might inhibit oligodendrocyte development in *Srf* mutants. To test this *in vivo*, we used an adenovirus to increase CTGF expression (Fig. 7). We injected mice with an adenovirus expressing CTGF (Ad-CTGF) or GFP as a control (Ad-GFP). We targeted CTGF (or GFP) expression ectopically around the lateral ventricle and ventrally to the corpus callosum; both regions were devoid of endogenous CTGF (Fig. 7a-e; see also Fig. 6). Notably, CTGF (or GFP)-expressing cells reproducibly localized in a Y-shaped pattern ventrally to the midline corpus callosum (Fig. 7a,c,d). This allowed us to monitor the consequences of CTGF application on oligodendrocyte development in this corpus callosum subregion.

Ad-CTGF reduced the number of MBP-positive oligodendrocytes by almost 40% compared with controls at 6 d postinfection (Ad-GFP, 47.3 ± 5.2 s.e.m. MBP-positive cells per 0.5 mm^2 ; Ad-CTGF, 28.8 ± 2.5 s.e.m.; $P = 0.0067$, $n = 7$ mice, each condition; Fig. 7f,g). At P12, we noticed an almost threefold decrease in MBP-positive oligodendrocytes in Ad-CTGF-injected mice (Ad-GFP, 34.1 ± 5.9 s.e.m. MBP-positive cells per 0.5 mm^2 ; Ad-CTGF, 12 ± 2.3 s.e.m.; $P = 0.0025$, $n \geq 8$ mice, each condition; Fig. 7h,i). Myelination in brain regions (for example, fimbria) that were not targeted by Ad-CTGF was not obviously altered.

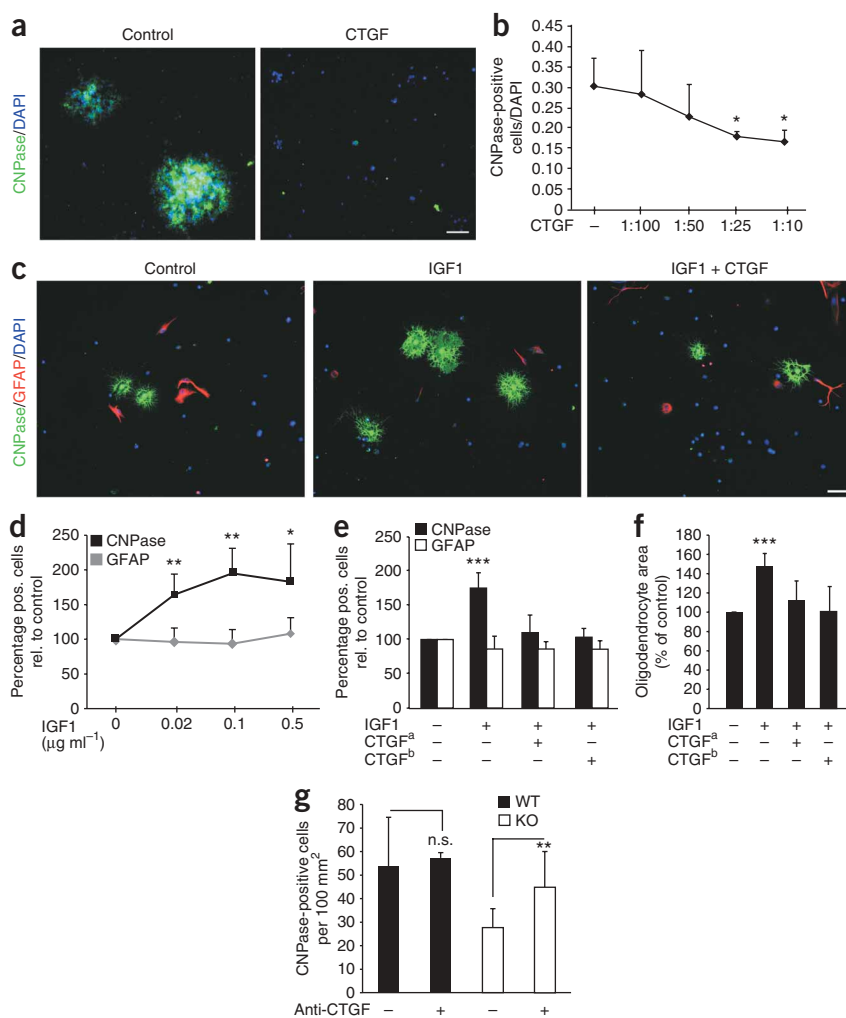


Figure 8 CTGF inhibits oligodendrocyte differentiation *in vitro* by counteracting IGF1. **(a)** We treated oligodendrocyte-enriched cultures with control fractions (left) or purified recombinant hCTGF (right). Cultures containing CTGF developed fewer CNPase-positive colonies than control treated cultures. **(b)** Similar to oligodendrocyte-enriched cultures **(a)**, incubation with CTGF, compared with control fractions, reduced the number of CNPase-positive oligodendrocytes in a dose-dependent manner in mixed neuron/glia cell cultures. **(c)** Mixed neuron/glia cultures derived from the hippocampus were incubated with insulin-free medium (left), IGF1-containing medium (middle) or in medium with IGF1 that was pre-incubated with CTGF (right). IGF1 strongly increased oligodendrocyte differentiation, as shown by an increase in the number and area of CNPase-positive oligodendrocytes (middle). Conversely, pre-incubation with CTGF blocked IGF1-mediated stimulation of oligodendrocyte differentiation (right). **(d)** IGF1 increased the number of CNPase-positive oligodendrocytes, but not astrocytes, in mixed neuron/glia cultures in a concentration-dependent manner. **(e,f)** Quantification of CNPase-positive oligodendrocyte and GFAP-positive astrocyte numbers **(e)** or the area taken occupied by individual oligodendrocytes **(f)** after the various treatments. CTGF^a, CTGF that we produced ourselves; CTGF^b, CTGF that we obtained commercially (Biomol). **(g)** CTGF immunodepletion by the addition of antibodies to CTGF to the growth medium increased oligodendrocyte numbers in *Srf* mutant, but not control mixed neuron/glia cultures. Error bars represent s.d. Scale bars represent 50 μm **(a,c)**. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ and *** $P \leq 0.001$.

To test this, we performed luciferase assays for *Cnp*, *Plp1*, *Mog*, *Tspan2*, *Hes5* and *Mbp* (**Supplementary Fig. 7** online) in HEK293 cells using constitutively active SRF-VP16. We evaluated the data by comparing it with *c-fos*, a well-established SRF target gene, whose induction resulted in a 15-fold stimulation. In sum, SRF-VP16 drove luciferase expression from all of the promoter constructs that we used. These data in HEK293 cells reveal general myelin promoter responsiveness to SRF-VP16; however, caution should be taken when extrapolating these results, which were acquired in HEK293 cells, to the situation of myelin promoter regulation exerted by wild-type SRF in oligodendrocytes.

DISCUSSION

Oligodendrocyte development by SRF involves CTGF

In the *Srf*^{-/-}; *Camk2a-iCre* mice that we used here, SRF ablation only occurred in neurons (**Supplementary Fig. 2**). Thus, all of the effects on oligodendrocytes involved an SRF function in neurons that was affecting macroglia in a non-cell autonomous manner. How would neuronal SRF mediate paracrine oligodendrocyte development? SRF could regulate secreted and/or membrane-associated signal(s) between neurons and OPCs/ oligodendrocytes. Consequently, SRF ablation could result in insufficient amounts of a stimulatory signal or elevated expression of an inhibitory signal. *Ctgf*, being transcriptionally repressed by SRF (**Fig. 6**), represents such an inhibitory signal. CTGF inhibited

oligodendrocyte development *in vivo* and *in vitro* (**Figs. 7** and **8**). How could CTGF mediate this inhibition? CTGF has IGFBP-like functions that result in IGF1 sequestration³⁸ and we found that IGF1-stimulated oligodendrocyte increase could be antagonized by CTGF (**Supplementary Fig. 7**). Because CTGF also binds to IGF2 (ref. 38), this mechanism probably also operates on IGF2-stimulated oligodendrocyte differentiation. Notably, the IGF/IGFBP signaling complex (for example, *Igf2* and *Igfbp6/7*) was strongly responsive to SRF (**Supplementary Table 2**). In *Srf* mutants, myelination onset appeared to be affected (**Fig. 3**), indicating that CTGF, which also affects cell adhesion and migration³¹, might interfere with initial oligodendrocyte-neuron recognition. In wild-type mice, the numbers of oligodendrocytes that are available to contact axons are tightly adjusted by trophic or apoptosis-inducing signals. Neuronally derived CTGF might contribute toward this fine-tuning of oligodendrocyte numbers by constituting a barrier that limits IGF diffusion and availability for oligodendrocyte maturation locally in the corpus callosum area and thereby preventing excess oligodendrocyte numbers. SRF appears to adjust IGF signaling by repressing or activating (via TGF β) the IGF antagonist CTGF (**Fig. 6**).

Our data indicate that CTGF is an important regulator of myelination in the corpus callosum. However, as CTGF is not expressed in all myelination areas, CTGF probably does not account for the full scope of myelination defects that are observed in *Srf* mutants.

SRF-mediated transcription in oligodendrocyte development

SRF's role in gene expression during oligodendrocyte development appears to be at least twofold. First, SRF might contribute to myelin gene activation in oligodendrocytes (**Supplementary Fig. 7**). Second, in neurons, SRF's influence on oligodendrocyte differentiation appeared to at least partially result from a repressive function, as shown for *Ctgf* (and other genes; see below). In contrast, SRF-VP16 appeared to counteract the repressive function of SRF by inducing rather than by repressing, *Ctgf*. It should be noted that SRF-VP16, unlike wild-type SRF, is not subject to the control mechanisms operating *in vivo*. A similar antagonism on oligodendrocyte maturation as that observed for wild-type SRF versus SRF-VP16 was described for OLIG2. OLIG2-VP16 blocks oligodendrocyte differentiation⁴³, whereas OLIG mouse mutagenesis^{44,45} demonstrates their crucial requirement for proper oligodendrocyte development¹.

SRF has been associated with gene repression in previous reports^{9–11}, which might be caused by SRF itself acting as a repressor, SRF acting in repressor recruitment or by directing micro-RNA synthesis. Notably, the expression of other SRF target genes, such as *c-fos* and *Cyr61* (which also belongs to the CCN family), are likewise increased in *Srf* mutants (data not shown). This indicates that SRF has a selective repressor function in basal gene transcription, which has to be distinguished from SRF's role in activating transcription on entry of exogenous stimuli (for example, TGF β), as we found for the *Ctgf* (**Fig. 6h**) and *c-fos* promoters (data not shown).

In *Srf* mutants, the amount of astrocytes was increased and the amount of oligodendrocytes was decreased. Our data suggest that CTGF is not crucially involved in regulating this astrocyte/ oligodendrocyte macroglia balance (**Fig. 8**). Oligodendrocytes in the brain arise from an early embryonic phase in the ventricular zone and a later phase in the subventricular zone (SVZ)^{1,46}. We previously described an enlarged SVZ that trapped neuronal precursors and thereby prevented migration along the rostral migratory stream¹². Similarly, we observed elevated levels of oligodendrocyte progenitors in the corpus callosum and adjacent SVZ in *Srf* mutants (**Fig. 2** and **Supplementary Figs. 3** and **4**). Thus, proper OPC migration might be impaired in *Srf* mutants, resulting in accumulation of OPCs that do not differentiate into mature oligodendrocytes. Notably, OPC accumulation has also been described in *Yy1* mutants⁴⁷, a transcription factor that interacts with SRF (for example, see ref. 48). This OPC accumulation in the *Srf* mutant SVZ might also impinge on the astrocyte-oligodendrocyte equilibrium. Therefore, SRF directs oligodendrocyte development by regulating CTGF/IGF signaling and by controlling the number of OPCs that are available for differentiation and astrocyte numbers.

METHODS

Conditional *Srf* mutants. We used *Srf*^{-/-}; *Camk2a-iCre* mutant mice and *Srf*^{+/-}; *Camk2a-iCre* or *Srf*^{+/-}; *Camk2a-iCre*-negative animals as wild types¹², in which Cre recombinase expression was induced in neurons by the *Camk2a* locus. The *Srf* gene was excised via *loxP* sites. The Regierungspräsidium Tübingen (IM 2/08) approved all of the mouse experiments used in this study.

Cell culture. We prepared mixed neuron/glia cultures from hippocampi as previously described¹⁴ and cortical cultures from embryonic day 17.5 embryos. For electroporation (Amaxa), we used 3 μ g of DNA and plated 10⁴ cells per 12-mm coverslip. Cultures were infected with lentivirus after 1 DIV²⁹. We cultured embryonic stem cells as described previously³⁵. In coculture experiments, we plated 10⁴ wild-type cells with 3 \times 10⁴ wild-type or *Srf* mutant hippocampal cells, which were visualized with DiAsp (10 μ g ml⁻¹ in Hanks Balanced Salt Solution) on 12-mm coverslips. Oligodendrocyte-enriched cultures were prepared on the basis of a previous study²⁸. Briefly, we plated cells from one pup in a 75-cm² flask and grew them in DMEM with 10% fetal calf

serum (vol/vol) for 10 d. The flasks were then shaken vigorously (16–18 h) in the incubator. We filtered supernatants (70- μ m sieve) and plated the cells on a bacterial-grade dish (30 min at 37 °C). We centrifuged supernatants (600 g for 10 min) and plated pellets on poly-L-lysine-coated coverslips in differentiation medium (DMEM with 0.5% fetal calf serum (vol/vol) and 10 ng ml⁻¹ ciliary neurotrophic factor, Peprotech) for 9 d.

We purified human HIS-tagged CTGF (a gift from M. Goppelt-Strube, University of Erlangen) from HEK293 supernatants. We added 0.1–10 μ g ml⁻¹ of CTGF to hippocampal and oligodendrocyte-enriched cultures for 3 consecutive days. We added IGF1 (R&D systems) at 3 DIV in NMEM medium containing insulin-free B27 supplement (Gibco). For IGF1/CTGF experiments, we pre-incubated 0.02 μ g ml⁻¹ IGF1 in a volume of 50 μ l for 30 min at 37 °C with 2 μ g ml⁻¹ CTGF that we produced ourselves or that was commercially available (Biomol). We stimulated cortical cultures for 1 h with 10 ng ml⁻¹ TGF β 1 or 2 (R&D systems). We added antibody to CTGF or control IgG (1 μ g per 500 μ l of medium) for 3 consecutive days to mixed hippocampal cultures.

Virus injection. Ad-GFP and Ad-CTGF (Vector Biolabs) have been described previously⁴⁹. We anaesthetized newborn mice by isoflurane inhalation and injected 1.5 μ l of virus solution into the lateral ventricle using a 33-gauge Hamilton syringe (**Fig. 7a**). We controlled virus delivery by co-injection of a fast green solution. Only the mice with uniform dye diffusion into the entire lateral ventricle were analyzed. We dissected brains at P6 or P12 for histological inspection. The experimental procedure is in accordance with institutional guidelines (Regierungspräsidium Tübingen; IM 2/08).

Quantification and statistics. For quantification of histology, we used Slidebook software (Intelligent Imaging Innovations). To compare pictures, we kept segmentation and object size thresholds identical, and measured either the total number of defined objects (reflecting cell number) or the total area (in pixels) of all objects (reflecting area engaged by all cells). We assessed statistical significance by two-tailed Student's *t*-test.

Note: Supplementary information is available on the Nature Neuroscience website.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to M. Schmid for help with GeneChips, J. Berger for electron microscopy, A. Sedlag for excellent student labwork and G. Schütz for the *Camk2a-cre* mice. We thank M. Jucker, G. Schrat and A. Wizenmann for critically reading the manuscript. B.K. is supported by the DFG Emmy Noether-program, Sonderforschungsbereich 446, the Schram-Stiftung and by young investigator grants from Tübingen University. A.N. is supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant NO 120/12-2).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

C.S. performed the experiments in **Figures 1, 2, 6** and **7**, in **Supplementary Figures 1–7** and in **Supplementary Tables 1** and **2**. S.S. carried out the experiments in **Figures 5, 6** and **8**, and in **Supplementary Figures 2** and **7**. K.H. performed the experiments in **Figures 4–6**. B.K. carried out the experiments in **Figures 3, 7** and **8**. D.S. provided excellent technical assistance throughout. T.M. and M.V. provided bioinformatical analysis. H.S. supervised the electron microscopy. A.N. supplied *Srf* mutants and co-designed the microarrays. B.K. supervised the study, designed the experiments and wrote the manuscript.

Published online at <http://www.nature.com/natureneuroscience/>
Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprintsandpermissions/>

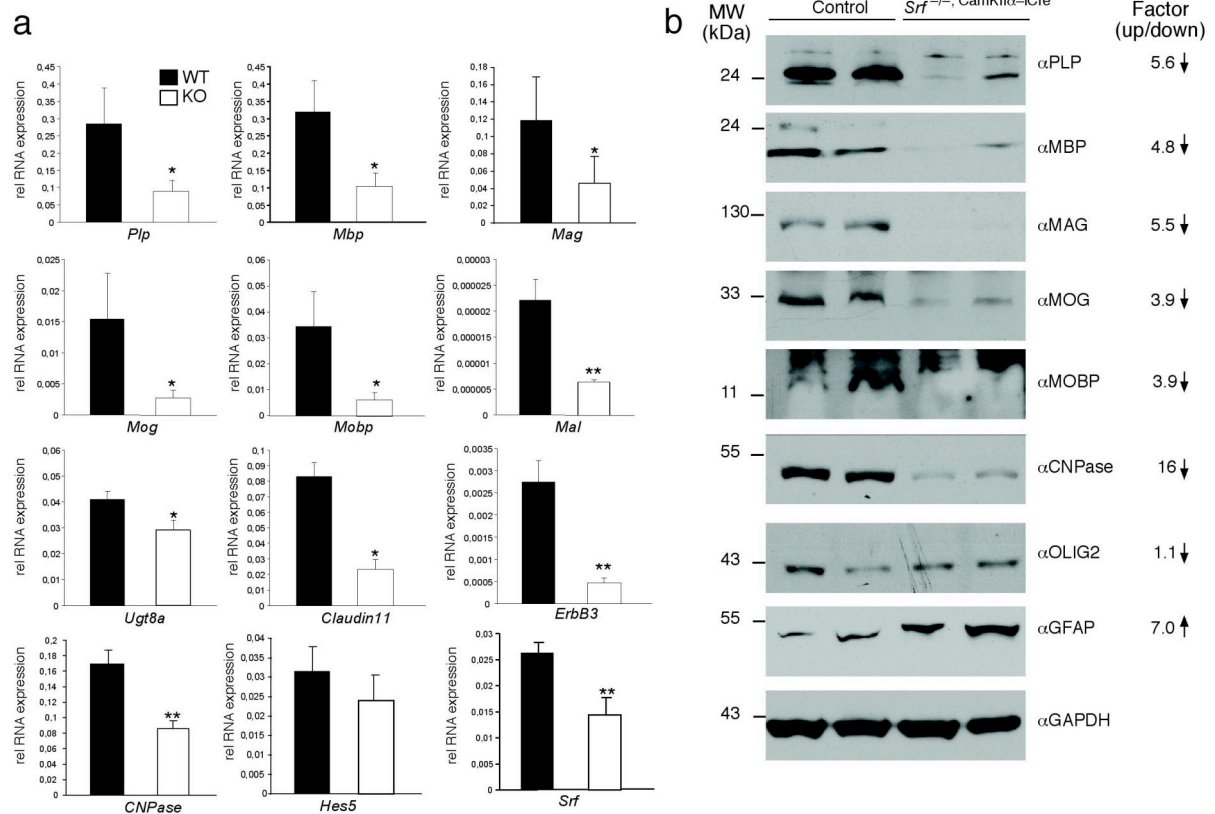
- Baumann, N. & Pham-Dinh, D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol. Rev.* **81**, 871–927 (2001).
- Durand, B. & Raff, M. A cell-intrinsic timer that operates during oligodendrocyte development. *Bioessays* **22**, 64–71 (2000).
- Bozzali, M. & Wrabetz, L. Axonal signals and oligodendrocyte differentiation. *Neurochem. Res.* **29**, 979–988 (2004).
- Chesik, D., De Keyser, J. & Wilczak, N. Insulin-like growth factor system regulates oligodendroglial cell behavior: therapeutic potential in CNS. *J. Mol. Neurosci.* **35**, 81–90 (2008).
- Simons, M. & Trajkovic, K. Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. *J. Cell Sci.* **119**, 4381–4389 (2006).
- Nicolay, D.J., Doucette, J.R. & Nazarali, A.J. Transcriptional control of oligodendrogenesis. *Glia* **55**, 1287–1299 (2007).

7. Wegner, M. A matter of identity: transcriptional control in oligodendrocytes. *J. Mol. Neurosci.* **35**, 3–12 (2008).
8. Posern, G. & Treisman, R. Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction. *Trends Cell Biol.* **16**, 588–596 (2006).
9. Ernst, W.H., Janknecht, R., Cahill, M.A. & Nordheim, A. Transcriptional repression mediated by the serum response factor. *FEBS Lett.* **357**, 45–49 (1995).
10. Rivera, V.M., Sheng, M. & Greenberg, M.E. The inner core of the serum response element mediates both the rapid induction and subsequent repression of c-fos transcription following serum stimulation. *Genes Dev.* **4**, 255–268 (1990).
11. Shaw, P.E., Frasch, S. & Nordheim, A. Repression of c-fos transcription is mediated through p67SRF bound to the SRE. *EMBO J.* **8**, 2567–2574 (1989).
12. Alberti, S. *et al.* Neuronal migration in the murine rostral migratory stream requires serum response factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 6148–6153 (2005).
13. Etkin, A. *et al.* A Role in Learning for SRF: Deletion in the adult forebrain disrupts LTD and the formation of an immediate memory of a novel context. *Neuron* **50**, 127–143 (2006).
14. Knoll, B. *et al.* Serum response factor controls neuronal circuit assembly in the hippocampus. *Nat. Neurosci.* **9**, 195–204 (2006).
15. Ramanan, N. *et al.* SRF mediates activity-induced gene expression and synaptic plasticity, but not neuronal viability. *Nat. Neurosci.* **8**, 759–767 (2005).
16. Wickramasinghe, S.R. *et al.* Serum response factor mediates NGF-dependent target innervation by embryonic DRG sensory neurons. *Neuron* **58**, 532–545 (2008).
17. Philippar, U. *et al.* The SRF target gene Fhl2 antagonizes RhoA/MAL-dependent activation of SRF. *Mol. Cell* **16**, 867–880 (2004).
18. Sun, Q. *et al.* Defining the mammalian CArGome. *Genome Res.* **16**, 197–207 (2006).
19. Cahoy, J.D. *et al.* A transcriptome database for astrocytes, neurons and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J. Neurosci.* **28**, 264–278 (2008).
20. Dugas, J.C., Tai, Y.C., Speed, T.P., Ngai, J. & Barres, B.A. Functional genomic analysis of oligodendrocyte differentiation. *J. Neurosci.* **26**, 10967–10983 (2006).
21. Manke, T., Roider, H.G. & Vingron, M. Statistical modeling of transcription factor binding affinities predicts regulatory interactions. *PLoS Comput. Biol.* **4**, e1000039 (2008).
22. Roider, H.G., Kanhere, A., Manke, T. & Vingron, M. Predicting transcription factor affinities to DNA from a biophysical model. *Bioinformatics* **23**, 134–141 (2007).
23. Erdmann, G., Schutz, G. & Berger, S. Inducible gene inactivation in neurons of the adult mouse forebrain. *BMC Neurosci.* **8**, 63 (2007).
24. Rivers, L.E. *et al.* PDGFRA/NG2 glia generate myelinating oligodendrocytes and piriform projection neurons in adult mice. *Nat. Neurosci.* **11**, 1392–1401 (2008).
25. Stallcup, W.B. The NG2 proteoglycan: past insights and future prospects. *J. Neurocytol.* **31**, 423–435 (2002).
26. Lappe-Siefke, C. *et al.* Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nat. Genet.* **33**, 366–374 (2003).
27. Hulshagen, L. *et al.* Absence of functional peroxisomes from mouse CNS causes dysmyelination and axon degeneration. *J. Neurosci.* **28**, 4015–4027 (2008).
28. McCarthy, K.D. & de Vellis, J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J. Cell Biol.* **85**, 890–902 (1980).
29. Dittgen, T. *et al.* Lentivirus-based genetic manipulations of cortical neurons and their optical and electrophysiological monitoring *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 18206–18211 (2004).
30. Chaqour, B. & Goppelt-Struebe, M. Mechanical regulation of the Cyr61/CCN1 and CTGF/CCN2 proteins. *FEBS J.* **273**, 3639–3649 (2006).
31. Leask, A. & Abraham, D.J. All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker. *J. Cell Sci.* **119**, 4803–4810 (2006).
32. Perbal, B. CCN proteins: multifunctional signaling regulators. *Lancet* **363**, 62–64 (2004).
33. Muehlich, S. *et al.* Actin-dependent regulation of connective tissue growth factor. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **292**, C1732–C1738 (2007).
34. Heuer, H. *et al.* Connective tissue growth factor: a novel marker of layer VII neurons in the rat cerebral cortex. *Neuroscience* **119**, 43–52 (2003).
35. Schratz, G. *et al.* Serum response factor is crucial for actin cytoskeletal organization and focal adhesion assembly in embryonic stem cells. *J. Cell Biol.* **156**, 737–750 (2002).
36. Vickers, E.R. & Sharrocks, A.D. The use of inducible engrailed fusion proteins to study the cellular functions of eukaryotic transcription factors. *Methods* **26**, 270–280 (2002).
37. Ivkovic, S. *et al.* Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. *Development* **130**, 2779–2791 (2003).
38. Kim, H.S. *et al.* Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 12981–12986 (1997).
39. Hsieh, J. *et al.* IGF-I instructs multipotent adult neural progenitor cells to become oligodendrocytes. *J. Cell Biol.* **164**, 111–122 (2004).
40. McMorris, F.A., Smith, T.M., DeSalvo, S. & Furlanetto, R.W. Insulin-like growth factor I/somatomedin C: a potent inducer of oligodendrocyte development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 822–826 (1986).
41. Kuhl, N.M., Hoekstra, D., De Vries, H. & De Keyser, J. Insulin-like growth factor-binding protein 6 inhibits survival and differentiation of rat oligodendrocyte precursor cells. *Glia* **44**, 91–101 (2003).
42. Ye, P., Carson, J. & D'Ercole, A.J. *In vivo* actions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on brain myelination: studies of IGF-I and IGF binding protein-1 (IGFBP-1) transgenic mice. *J. Neurosci.* **15**, 7344–7356 (1995).
43. Zhou, Q., Choi, G. & Anderson, D.J. The bHLH transcription factor Olig2 promotes oligodendrocyte differentiation in collaboration with Nkx2.2. *Neuron* **31**, 791–807 (2001).
44. Lu, Q.R. *et al.* Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection. *Cell* **109**, 75–86 (2002).
45. Zhou, Q. & Anderson, D.J. The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification. *Cell* **109**, 61–73 (2002).
46. Rowitch, D.H. Glial specification in the vertebrate neural tube. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 409–419 (2004).
47. He, Y. *et al.* The transcription factor Yin Yang 1 is essential for oligodendrocyte progenitor differentiation. *Neuron* **55**, 217–230 (2007).
48. Natesan, S. & Gilman, M. YY1 facilitates the association of serum response factor with the c-fos serum response element. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 5975–5982 (1995).
49. Liu, H. *et al.* Cysteine-rich protein 61 and connective tissue growth factor induce deadhesion and anoikis of retinal pericytes. *Endocrinology* **149**, 1666–1677 (2008).

SUPPLEMENTARY TEXT

Paracrine control of oligodendrocyte differentiation by SRF-directed neuronal gene expression

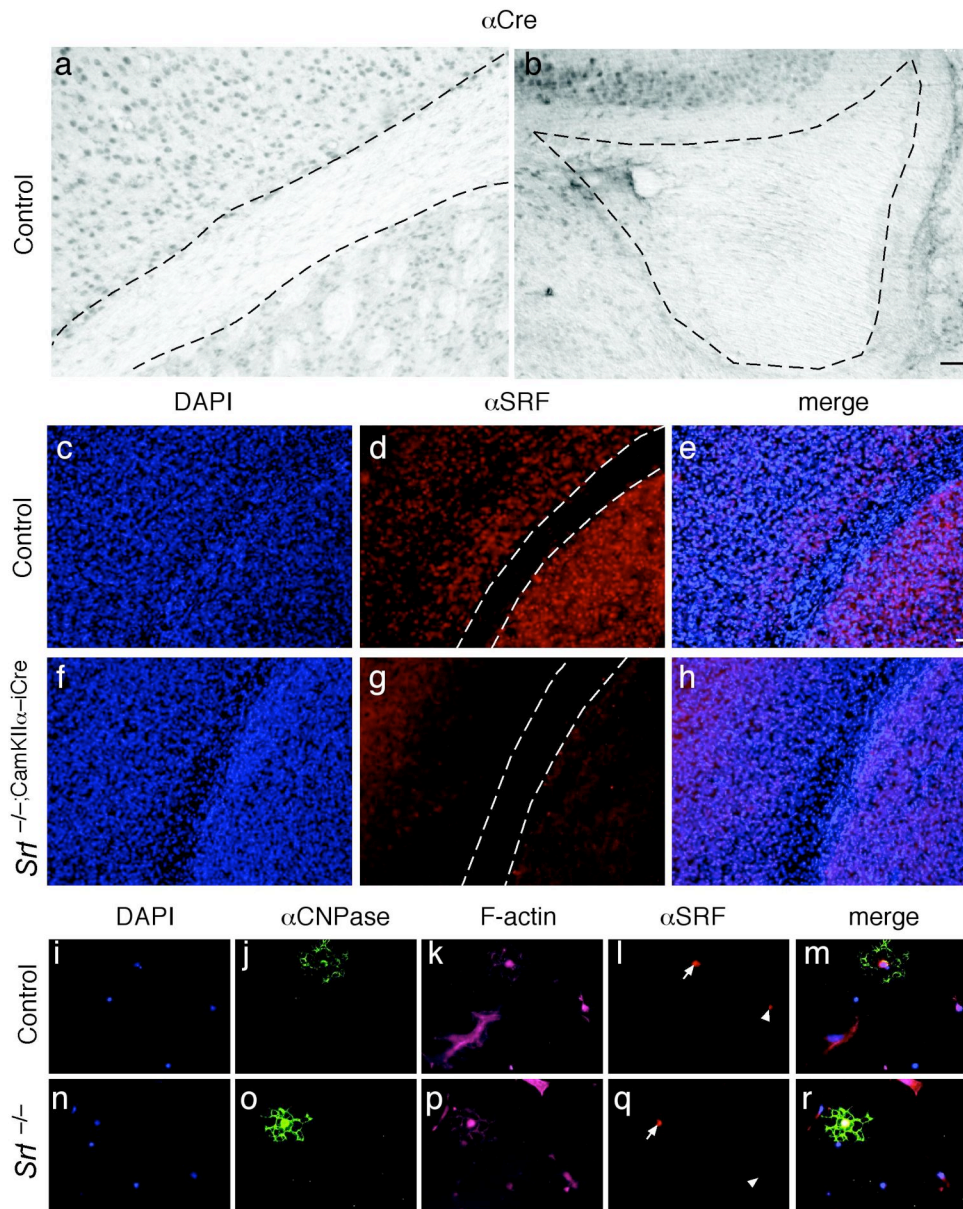
Christine Stritt, Sina Stern, Kai Harting, Thomas Manke, Daniela Sinske, Heinz Schwarz, Martin Vingron, Alfred Nordheim and Bernd Knöll*



Supplementary Figure 1: Impaired myelin gene expression in *Srf* mutants

a) cDNA from P14 hippocampi RNA was subjected to qPCR employing primer pairs for genes indicated. RNA levels of all structural genes building the myelin sheath (*Plp*, *Mbp*, *Mag*, *Mog* and *Mobp*) are down-regulated in *Srf* mutants. Additionally SRF ablation impinges on myelin marker gene expression (*Claudin11*, *Cnpase* and *Ugt8a*).

b) Protein extracts of P14 control and *Srf* mutant hippocampi (doublets each) were prepared and subjected to western blotting using indicated antibodies. The average fold-change in protein expression normalized to GAPDH is given. In line with genechip (**Fig. 1**) and qRT-PCR data (**a**), myelin proteins are down-regulated in *Srf* mutants. OLIG2 is not affected by SRF-deficiency. GFAP, an astrocyte marker, is elevated in *Srf* mutants.



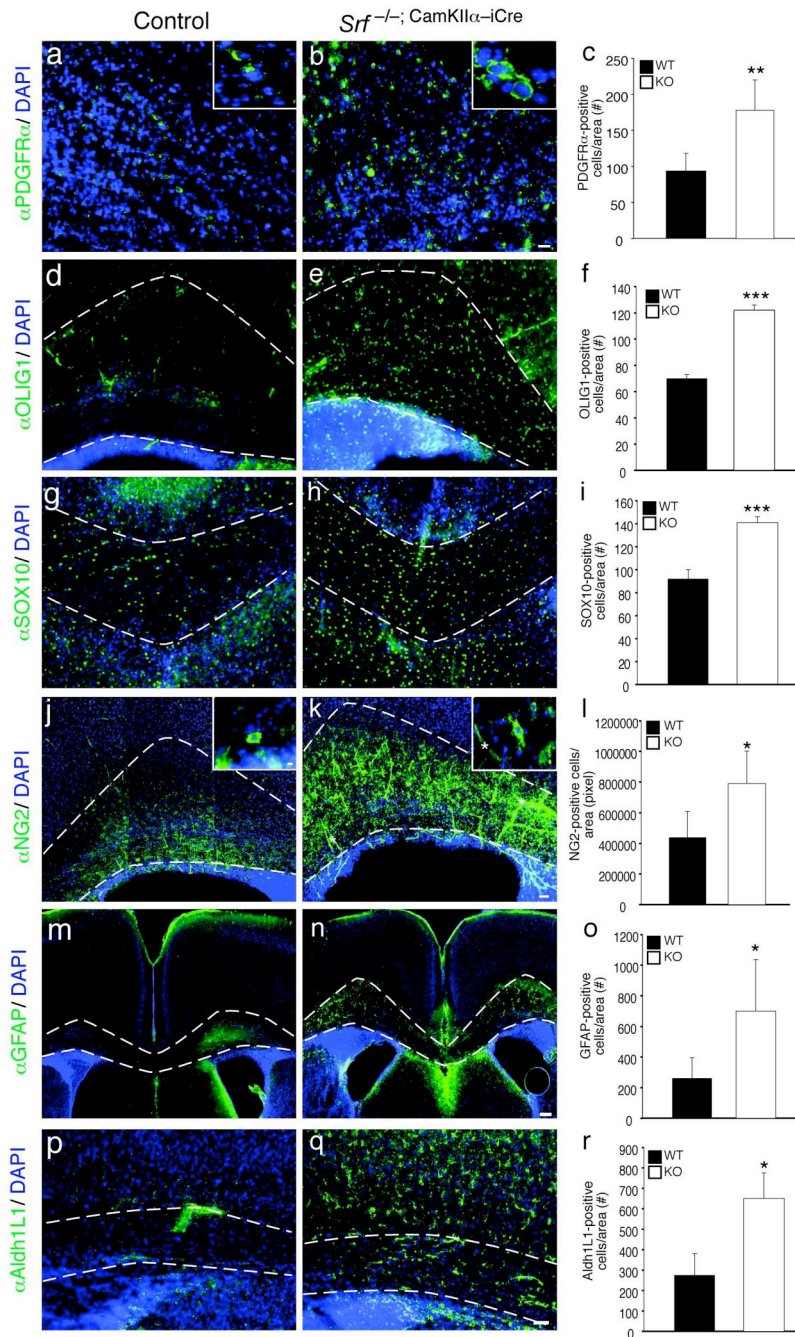
Supplementary Figure 2: SRF ablation in *Srf*^{-/-}; *CamKII α -iCre* mice was confined to neurons only

a, b) We stained P15 control mice for Cre-recombinase expression in two white matter areas, the corpus callosum (dashed lines, **a**) and the hippocampal fimbria (dashed lines, **b**). Cre-expression was only found in cortical (**a**) and hippocampal (**b**) neuronal cell bodies, but not in white matter areas.

c-h) We monitored SRF expression (**d, g**) on P15 sections derived of control (**c-e**) and *Srf* mutants (**f-h**). DAPI counterstain (**c, f**) is provided to estimate cell numbers. SRF in controls (**d, e**) is mostly confined to cortical and striatal neurons. Oligodendrocytes in the corpus callosum (dashed line) are stained weakly. In *Srf* mutants (**g, h**) expectedly, SRF signals in the cortex and striatum are absent.

i-r) Mixed neuron-glia cultures of control (**i-m**) and *Srf* mutant pups (**n-r**) were stained for DAPI (**i, n**), CNPase (**j, o**), F-Actin (**k, p**) and SRF (**l, q**). In control cultures (**i-m**), only CNPase⁺ oligodendrocytes (arrow in **l**) and neurons (arrowhead in **l**) express SRF. In *Srf* mutant cultures (**n-r**), expectedly SRF levels drop in neurons (arrowhead in **q**), but not in oligodendrocytes (arrow in **q**), thus indicating – in line with the *in vivo* situation (**a-h**) – that *CamKII α* -mediated recombination is neuron-exclusive.

Scale-bar (**a-r**) = 50 μ m



Supplementary Figure 3: OPCs and astrocytes in *Srf*^{-/-} were up-regulated at P5

a–c) PDGFR α ⁺ cells were elevated in *Srf*^{-/-}. Inserts reveal higher magnifications of individual PDGFR α ⁺ cells. **(c)** Quantification of PDGFR α ⁺ cells in the corpus callosum.

d–f) OLIG1⁺ cells were increased in *Srf*^{-/-} **(e)** compared to wild-type **(d)**. **(f)** Quantification depicts numbers of OLIG1-positive cells in the corpus callosum.

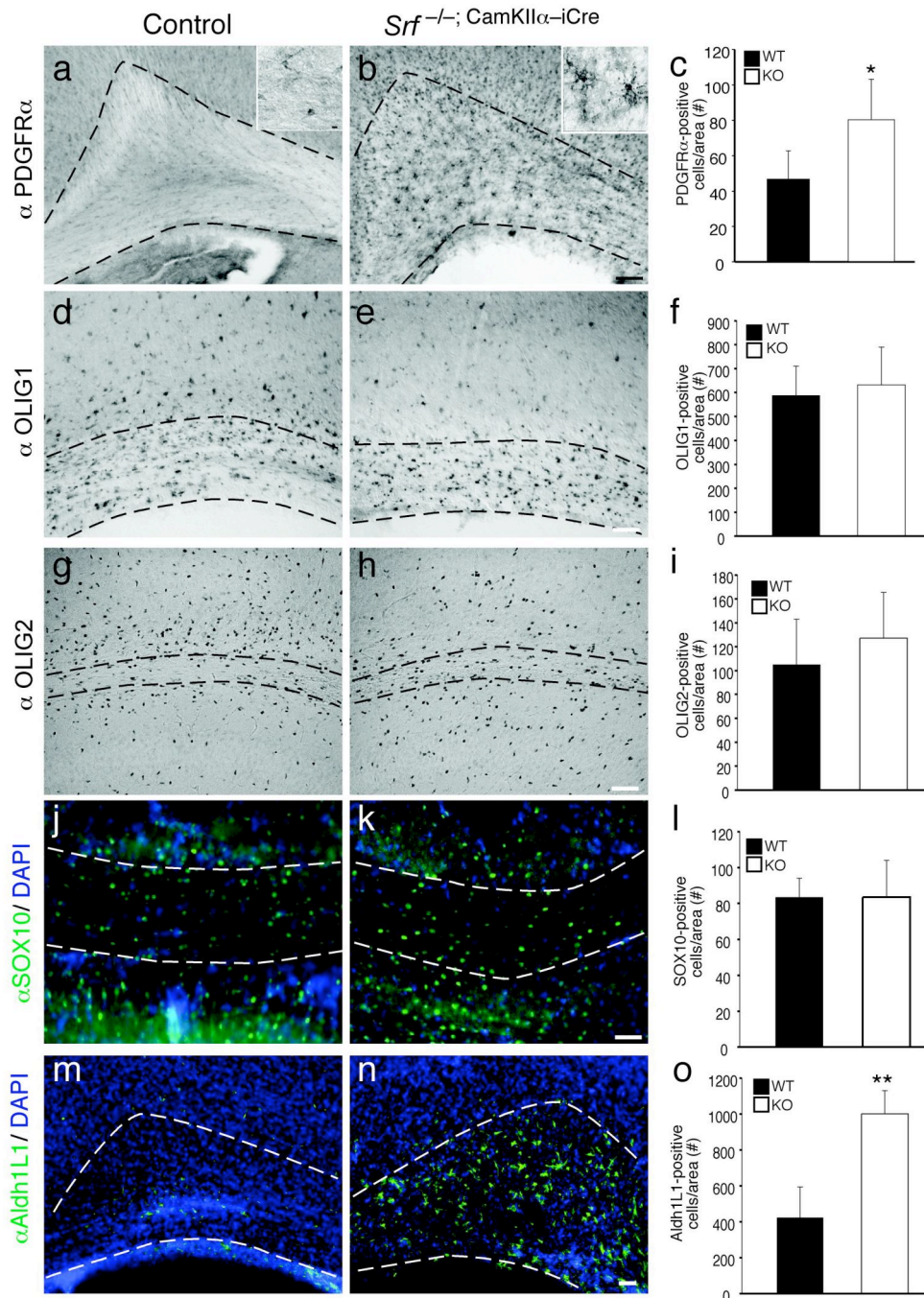
g–i) SOX10⁺ OPCs were elevated in *Srf* mutants **(h)** compared to wild-type **(g)**. **(i)** Quantification depicts numbers of SOX10-positive cells in the corpus callosum.

j–l) More NG2⁺ cells were found in *Srf*^{-/-}. Inserts reveal higher magnifications of NG2⁺ cells. Asterisks show blood vessels. **(l)** Quantification of NG2⁺ cells in the corpus callosum.

m–o) More GFAP⁺ astrocytes were found in *Srf* mutants **(n)** compared to wild-type **(m)**. **(o)** Quantification depicts numbers of GFAP-positive cells.

p–r) Aldh1L1, a novel pan-astrocyte marker, was elevated in *Srf* mutants **(q)** compared to wild-type **(p)**. **(r)** Quantification depicts numbers of Aldh1L1-positive cells/area in the corpus callosum. White dashed lines indicate the corpus callosum.

Scale-bar **(a, b)** = 20 μ m, **(d–h, j, k, p, q)** = 50 μ m; **(m, n)** = 200 μ m; inserts = 5 μ m



Supplementary Figure 4: NG2⁺ and PDGFR α ⁺ OPCs and astrocytes in *Srf* mutants were up-regulated at P16

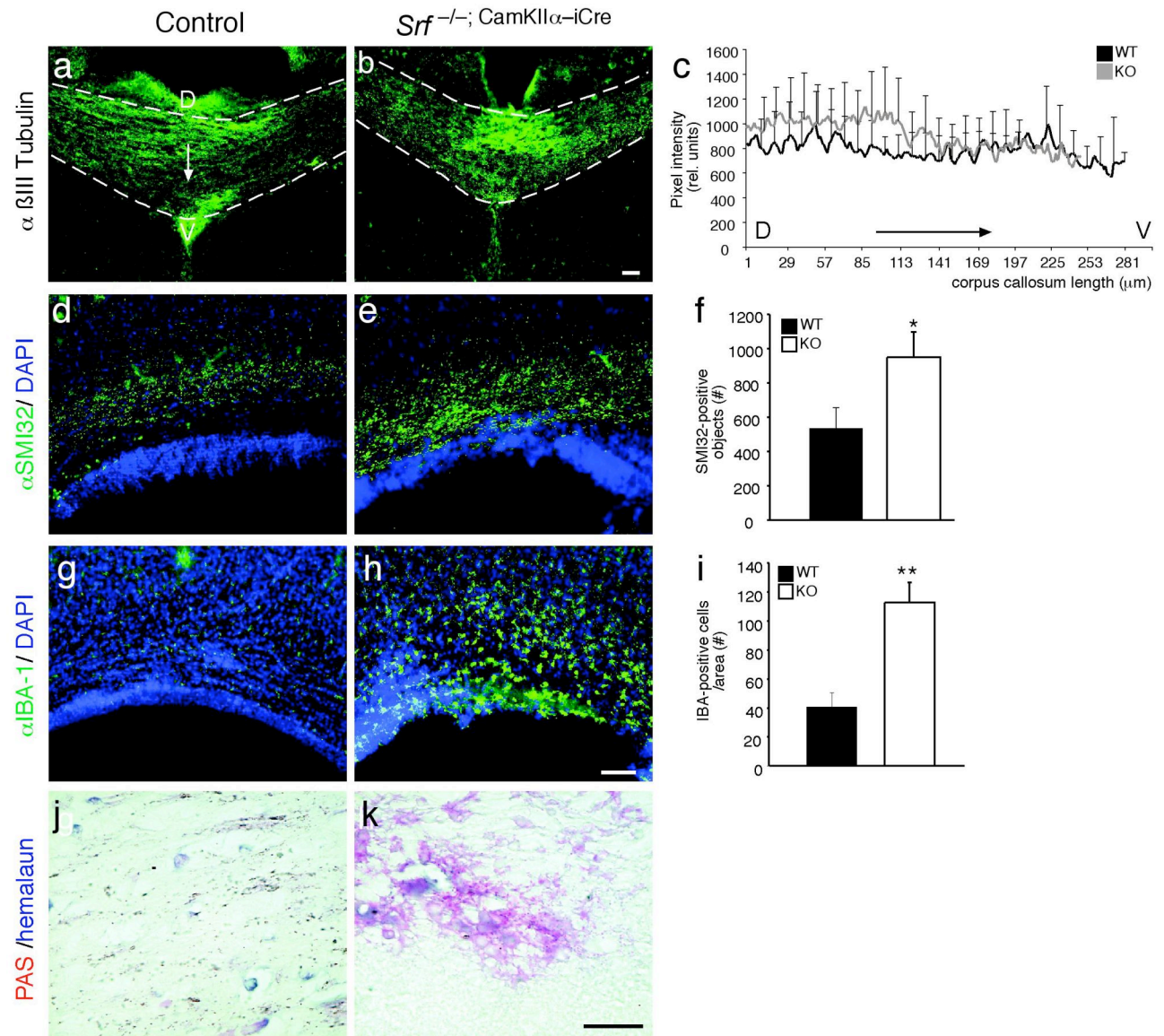
a–c) PDGFR α ⁺ cells were elevated in *Srf* mutants (**b**) compared to wild-type (**a**). Inserts depict PDGFR α ⁺ cells, which in *Srf* mutants (**b**) acquire a star-like shape reminiscent of NG2⁺ cells (see **Fig. 2f**). (**c**) Quantification of PDGFR α ⁺ cells in the corpus callosum.

d–f) Numbers of OLIG1-positive cells were comparable between *Srf* mutants (**e**) and wild-type (**d**). (**f**) Quantification of OLIG1-positive cells in the corpus callosum.

g–i) OLIG2⁺ cells were slightly, but statistically not-significantly elevated in *Srf*^{-/-} (**h**) compared to wild-type (**g**). (**i**) Quantification of OLIG2-positive cells in the corpus callosum.

j–l) Numbers of SOX10-positive cells were not altered between *Srf* mutants (**k**) and wild-type (**j**). (**l**) Quantification depicts numbers of SOX10-positive cells in the corpus callosum.

m–o) Aldh1L1 was elevated in *Srf*^{-/-} (**n**) compared to wild-type (**m**). (**o**) Quantification of Aldh1L1⁺ cells in the corpus callosum. White dashed lines indicate corpus callosum borders. Scale-bar (**a, b**) = 100 μ m; (**d–n**) = 50 μ m; inserts = 10 μ m



Supplementary Figure 5: Quantification of axon number and degeneration in *Srf* mutants

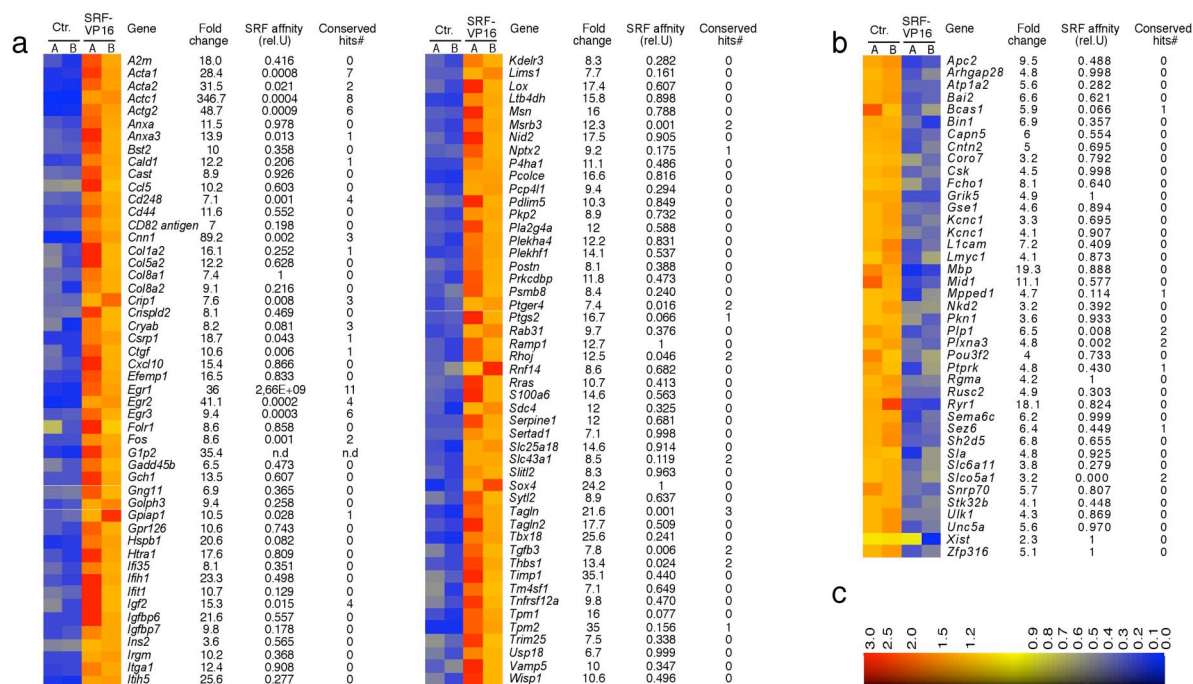
(a–c) Staining for β III-Tubulin in the area of the corpus callosum (dashed lines) indicates comparable thickness between controls (a) and *Srf* mutants (b). In (c) the relative pixel intensity of axons (ordinate) is plotted against the corpus callosum diameter in μm (abscissae) along the corpus callosum dorsal (D)-ventral (V) axis. The orientation of the d-v axis is indicated by arrows.

(d–f) SMI32 antibodies recognize unphosphorylated neurofilaments, which are characteristic for axonal damage. In *Srf* mutants (e) we measured (f) increased levels of nonphosphorylated neurofilaments compared to control (d) corpus callosum.

(g–i) Microglia were visualized with antibodies to IBA-1. In the *Srf* mutant corpus callosum (h) microglia numbers were compared to controls (g) strongly elevated (i).

(j, k) Periodic acid-Schiff stain (PAS; in red) recognizes accumulations of carbohydrate-rich material, which are frequently used as a sign of axonal degeneration. We noticed PAS-positive material in the area of *Srf* mutant corpus callosum axons (k), but not in controls (j).

Scale-bar (a, b) = 50 μm ; (d–h) = 100 μm ; (j, k) = 50 μm



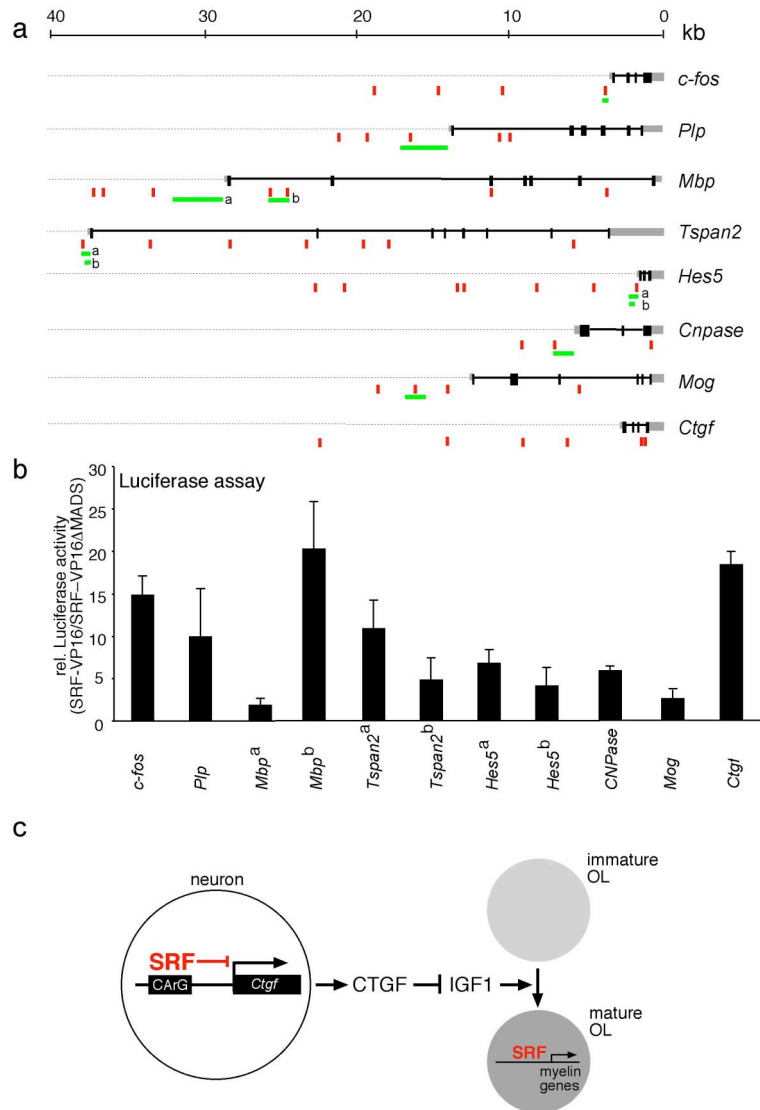
Supplementary Figure 6: GeneChip data of SRF-VP16 expressing cortical neurons

E17.5 wild-type cortical neurons were electroporated with SRF-VP16 and subjected to Affymetrix GeneChip analysis.

(a) Genes induced at least two-fold and of $P \leq 0.05$ are depicted. In line with other studies^{11, 12} many well-known SRF target genes including *Actin* isoforms, *Egr1*, 2, 3 and *c-fos* were strongly induced. The relative SRF promoter affinity is indicated with lowest values predicting highest affinity. Additionally, the number of species-conserved SRF binding sites is indicated (see also **Supp. Table 2**).

(b) Genes down-regulated upon SRF-VP16 overexpression with respective factors, predicted SRF affinity and number of conserved SRF binding sites.

(c) Scale indicating relative signal strength of color-coded bars.



Supplementary Figure 7: SRF drove myelin promoter expression *in vitro*

(a) Scheme of promoters studied for SRF regulation. Promoters are highlighted by dotted lines with red squares indicating putative SRF binding sites close to the transcriptional start site (TSS). Regions for luciferase constructs are depicted with green bars. Introns of coding regions are shown in black solid lines and exons as black squares. Grey bars mark TSS and 3' UTR.

(b) Luciferase activity in HEK293 cells driven by SRF-VP16 (in relation to SRF-VP16ΔMADS) of the indicated promoters. As reference *c-fos*, a well-known SRF target gene, is included, which was induced approximately 15-fold. In sum, all myelin gene promoters were induced by SRF-VP16. Interestingly, whereas putative SRF binding sites upstream of the *Mbp* TSS were only weakly recognized by SRF-VP16 (*Mbp^a*), a luciferase construct covering those in the first intron strongly drove luciferase expression (*Mbp^b*).

(c) Scheme depicting how wild-type SRF might contribute via a paracrine mechanism to oligodendrocyte development involving repression of CTGF levels in neurons. CTGF secreted by neurons in turn inhibits oligodendrocyte differentiation by sequestering and thereby limiting IGF1-mediated oligodendrocyte maturation. Additionally, within oligodendrocytes, SRF might contribute to myelin gene expression.

Supplementary Table 1

P14 hippocampus Affymetrix Chip data

Hippo P14 2-fold down

Gene Symbol	Full name	Ensemble number	factor	SRF affinity	cons. hits #
Actb	actin, beta, cytoplasmic	ENSMUSG00000029580	2.5	0.00299727269646044	4
Adamts4	a disintegrin-like and metalloproteinase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 4	ENSMUSG000000006403	4.1	0.510526841685316	0
Arid4b	AT rich interactive domain 4B (Rbp1 like)	ENSMUSG000000039219	2.1	0.961366617184197	0
Aspa	aspartoacylase (aminoacylase) 2	ENSMUSG000000020774	2.2	0.0065602191803501	2
Atm	ataxia telangiectasia mutated homolog (human)	ENSMUSG000000034218	3.4	0.301925453759436	2
Cldn11	claudin 11	ENSMUSG000000037625	4.1	0.923612381899523	0
Cnksr3	Cnksr family member 3	ENSMUSG00000015202	3.1	0.853761141617532	0
Cnp1	cyclic nucleotide phosphodiesterase 1	ENSMUSG00000006782	3.4	0.0333725010506601	0
Ddit4l	DNA-damage-inducible transcript 4-like	ENSMUSG00000046818	3.7	0.336834736211449	0
Dsp	desmoplakin	ENSMUSG000000054889	2.6	0.541569274406913	0
Eg2	endothelial differentiation, lysophosphatidic acid G-protein-coupled receptor, 2	ENSMUSG000000038668	2.2	0.420869084360386	0
Elov1	elongation of very long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, yeast)-like 1	ENSMUSG00000006390	2	0.0850628781634489	1
Elov7	ELOVL family member 7, elongation of long chain fatty acids (yeast)	ENSMUSG000000021696	2.7	0.646472352957851	0
Enpp6	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 6	ENSMUSG000000038173	2.7	0.40178388689381	0
Erb3	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)	ENSMUSG00000018166	4.2	0.372085125043201	0
Fa2h	fatty acid 2-hydroxylase	ENSMUSG000000033579	3.4	0.717247502384195	0
Fbxo30	F-box protein 30	ENSMUSG000000047648	2.4	0.508364583718803	0
Fzd2	frizzled homolog 2 (Drosophila)	ENSMUSG000000050288	2.2	0.68224600238545	1
Gamt	guanidinoacetate methyltransferase	ENSMUSG000000020150	2.1	0.83277631518658	0
Gdpd3	glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 3	ENSMUSG000000030703	2.2	0.946530636011695	0
Gja12	gap junction membrane channel protein alpha 12	ENSMUSG000000043448	2.7	0.371821494149382	0
Gsn	gelsolin	ENSMUSG000000026879	2.9	0.070927657239702	2
Hes5	hairly and enhancer of split 5 (Drosophila)	ENSMUSG000000048001	2.4	0.495654585650474	0
Mag	myelin-associated glycoprotein	ENSMUSG000000036634	7.1	0.87257219225657	0
Mal	myelin and lymphocyte protein, T-cell differentiation protein	ENSMUSG000000027375	11.4	0.723018928645835	0
Manba	mannosidase, beta A, lysosomal	ENSMUSG000000028164	2.5	0.95498278584588	0
Mbp	myelin basic protein	ENSMUSG000000041607	6.6	0.88829715817387	0
Mobp	myelin-associated oligodendrocytic basic protein	ENSMUSG000000032517	15.3	0.550121665359711	0
Mog	myelin oligodendrocyte glycoprotein	ENSMUSG000000076439	11.1	0.0780758906084726	1
Nfasc	Neurofascin, mRNA (cDNA clone IMAGE:5686983)	ENSMUSG000000026442	2.3	0.783657203609592	0
Pdlim2	PDZ and LIM domain 2	ENSMUSG000000022090	2.6	0.430347530083901	0
Plekhh1	pleckstrin homology domain containing, family H (with MyTH4 domain) member 1	ENSMUSG000000060716	2.8	0.306942119683332	1
Pip1	proteolipid protein (myelin) 1	ENSMUSG000000031425	5.6	0.00889358477932778	2
Ppp1r14a	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14A	ENSMUSG000000037186	4.5	0.130427903324267	0
Selepl	selectin, platelet (p-selectin) ligand	ENSMUSG000000048163	2.4	0.313950821611345	0
Sox11	SRY-box containing gene 11 (Sox11), mRNA	ENSMUSG000000063632	3.8	0.946415110000083	0
Srf	serum response factor	ENSMUSG000000015605	2.4	0.000181248361906139	4
Tmem10	transmembrane protein 10	ENSMUSG000000050121	11.9	0.572238079691921	0
Tsh22	serologically defined colon cancer antigen 33 like	ENSMUSG000000047907	3.1	0.271202632760714	0
Tspan2	tetraspan 2	ENSMUSG000000027858	3.3	0.201335528347	2
Ttc14	tetratricopeptide repeat domain 14	ENSMUSG000000027677	2.1	0.857330059120023	0
Ugt8a	UDP galactosyltransferase 8A	ENSMUSG000000032854	6.2	0.64217573493223	0
Wfs1	Wolfram syndrome 1 homolog (human)	ENSMUSG000000039474	2.3	0.0372579007459073	1
Xlr3a	X-linked lymphocyte-regulated 3A ; X-linked lymphocyte-regulated 3B ; hypothetical protein LOC574437	ENSMUSG000000057836	3.1	1	0

Hippo P14 2-fold up

Gene Symbol	Full name	Ensemble number	factor	SRF affinity	cons. hits #
A2m	alpha-2-macroglobulin	ENSMUSG000000030111	2.9	0.416096439929475	0
Adarb2	adenosine deaminase, RNA-specific, B2	ENSMUSG000000052551	2.2	0.676731535703297	0
Arndc4	arrestin domain containing 4	ENSMUSG000000042659	2.7	0.282581097367173	1
Arsb	Arylsulfatase B (ArSB), mRNA	ENSMUSG000000042093	2.4	0.214801972592915	0
C4	complement component 4 (within H-2S)	ENSMUSG000000015451	5.5	0.954174622443195	0
Ccl12	chemokine (C-C motif) ligand 12	ENSMUSG000000035352	3.4	0.805818592488674	0
Cirbp	cold inducible RNA binding protein	ENSMUSG000000045193	2.4	0.0136689040893519	1
Dnct2b	dynactin, cytoplasmic, light chain 2B	ENSMUSG000000034467	2.7	0.901942537471279	0
Edg3	endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 3	ENSMUSG000000067586	2.2	0.413349995048321	0
Gfap	Glial fibrillary acidic protein, mRNA (cDNA clone IMAGE:40045436)	ENSMUSG000000020932	2.9	0.452548919504615	0
Glic1	Glucocorticoid induced transcript 1 (Glic1), transcript variant 1, mRNA	ENSMUSG000000029638	3.1	0.347670468558438	0
Glycam1	glycosylation dependent cell adhesion molecule 1	ENSMUSG000000022491	4.5	1	0
Gna13	guanine nucleotide binding protein, alpha 13	ENSMUSG000000020611	2.4	0.657736953208974	0
Irs4	insulin receptor substrate 4	ENSMUSG000000054667	4.5	0.44328074833549	0
Lgals3	lectin, galactose binding, soluble 3	ENSMUSG000000050335	3	0.491277030117962	0
Lsm8	LSM8 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae) (Lsm8), mRNA	ENSMUSG000000044155	5.7	0.931454844516179	0
Lyzs	lysozyme	ENSMUSG000000069516	2.3	0.206923942204333	0
Mgst1	microsomal glutathione S-transferase 1	ENSMUSG000000008540	2.3	0.289634932071225	0
Mrp15	mitochondrial ribosomal protein L15	ENSMUSG000000033845	3.4	0.921054124199181	0
Rcor3	REST corepressor 3 (Rcor3), mRNA	ENSMUSG000000037395	2.4	0.56932680812171	0
Rsh13	radial spokehead-like 3	ENSMUSG000000039552	2.2	0.986338709971967	0
S100a4	S100 calcium binding protein A4	ENSMUSG00000001020	4.7	0.274009660247321	0
Sfrs7	splicing factor, arginine/serine-rich 7	ENSMUSG000000024097	2.2	0.939724034890574	0
T2bp	Traf2 binding protein	ENSMUSG000000046888	3.1	0.955407932746933	0
Thbs4	thrombospondin 4	ENSMUSG000000021702	2.3	0.848520843565488	0
Tlk2	tousled-like kinase 2 (Arabidopsis)	ENSMUSG000000020694	2.2	0.317451570933223	0
Txnip	thioredoxin interacting protein	ENSMUSG000000038393	2.4	0.76689964245619	0
Ugt1a2	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A2	ENSMUSG000000054545	2.7	0.655446440051682	0
Xik1	extra cellular link domain-containing 1	ENSMUSG000000030787	2.1	0.144539965330289	0

Supplementary Table 2

SRF-VP16 cortical culture Affymetrix Chip data

WT VP16 up

Gene Symbol	Full name	Ensemble number	factor	SRF affinity	cons. hits #
A2m	alpha-2-macroglobulin	ENSMUSG00000030111	18	0.416096439929475	0
Acta1	actin, alpha 1, skeletal muscle	ENSMUSG00000031972	28.4	0.000797272776552505	7
Acta2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	ENSMUSG00000035783	31.5	0.021582871714973	2
Actc1	actin, alpha, cardiac	ENSMUSG000000068614	346.7	0.000403086623975812	8
Actg2	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	ENSMUSG000000059430	48.7	0.000969353263129637	6
Anxa1	annexin A1	ENSMUSG00000024659	11.5	0.97684269568486	0
Anxa3	annexin A3	ENSMUSG00000029484	13.9	0.0131902214217859	1
Bst2	bone marrow stromal cell antigen 2	ENSMUSG00000046718	10	0.358147331679049	0
Cald1	caldesmon 1	ENSMUSG00000029761	12.2	0.206382224460704	1
Cast	calpastatin	ENSMUSG00000021585	8.9	0.926912514779055	0
Cd5	chemokine (C-C motif) ligand 5	ENSMUSG00000035042	10.2	0.603640447191836	0
Cd248	CD248 antigen, endosialin	ENSMUSG00000056481	7.1	0.00162971022872715	4
Cd44	CD44 antigen	ENSMUSG00000005087	11.6	0.552271025292686	0
Cd82	CD82 antigen	ENSMUSG00000027215	7	0.198676150882779	0
Cnn1	calponin 1	ENSMUSG00000001349	89.2	0.0018198614720214	3
Col1a2	procollagen, type I, alpha 2	ENSMUSG00000029661	16.1	0.25279629620308	1
Col5a2	procollagen, type V, alpha 2	ENSMUSG00000026042	12.2	0.628821821163678	0
Col8a1	procollagen, type VIII, alpha 1	ENSMUSG00000068196	7.4	1	0
Col8a2	procollagen, type VIII, alpha 2	ENSMUSG00000056174	9.1	0.216761928997354	0
Crip1	cysteine-rich protein 1 (intestinal)	ENSMUSG00000006360	7.6	0.00868659084273737	3
Crispld2	cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 2	ENSMUSG000000031825	8.1	0.469567495673672	0
Cryab	crystallin, alpha B	ENSMUSG000000032060	8.2	0.0812640364221974	3
Csrp1	cysteine and glycine-rich protein 1	ENSMUSG00000026421	18.7	0.043280761936981	1
Ctgf	connective tissue growth factor	ENSMUSG000000019997	10.6	0.00654388230670677	1
Cxcl10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	ENSMUSG00000034855	15.4	0.86670111294001	0
Efemp1	epidermal growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	ENSMUSG00000020467	16.5	0.83385422590769	0
Egr1	early growth response 1	ENSMUSG00000038418	36	2.66E+09	11
Egr2	early growth response 2	ENSMUSG00000037868	41.1	0.000238341664279274	4
Egr3	early growth response 3	ENSMUSG00000033730	9.4	0.000297081963991475	6
Folr1	folate receptor 1 (adult)	ENSMUSG00000001827	8.6	0.858482313490544	0
Fos	FBJ osteosarcoma oncogene	ENSMUSG000000021250	8.6	0.00148918825990185	2
G1p2	interferon, alpha-inducible protein	n.d.	35.4	n.d.	n.d.
Gadd45b	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta	ENSMUSG00000015312	6.5	0.473121687851794	0
Gch1	GTP cyclohydrolase 1	ENSMUSG00000037580	13.5	0.607407805767139	0
Gng11	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 11	ENSMUSG00000032766	6.9	0.365217822001255	0
Golph3	golgi phosphoprotein 3	ENSMUSG00000022200	9.4	0.258612588890678	0
Gpiap1	GPI-anchored membrane protein 1	ENSMUSG00000027184	10.5	0.0282071248986638	1
Gpr126	G protein-coupled receptor 126	ENSMUSG000000039116	10.6	0.743259528092831	0
Hspb1	heat shock protein 1	ENSMUSG00000047061	20.6	0.0824771492081637	0
Htra1	Htra serine peptidase 1	ENSMUSG00000006205	17.6	0.809328339156744	0
Ifi35	interferon-induced protein 35	ENSMUSG00000010358	8.1	0.351207601398547	0
Ifi1	interferon induced with helicase C domain 1	ENSMUSG00000026896	23.3	0.49896976859136	0
Ifi1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	ENSMUSG00000034459	10.7	0.129550368603642	0
Igf2	insulin-like growth factor 2	ENSMUSG00000048583	15.3	0.0151761370933254	4
Igfbp6	insulin-like growth factor binding protein 6	ENSMUSG00000023048	21.6	0.55708655668034	0
Igfbp7	insulin-like growth factor binding protein 7	ENSMUSG00000036256	9.8	0.178119854050603	0
Ins2	insulin II	ENSMUSG00000000215	3.6	0.56578438007041	0
Irgm	immunity-related GTPase family, M	ENSMUSG00000046879	10.2	0.368535873372692	0
Irga1	integrin alpha 1	ENSMUSG00000063330	12.4	0.908702034161772	0
Ithi5	inter-alpha (globulin) inhibitor H5	ENSMUSG00000025780	25.6	0.277907072818893	0
Kdel3	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 3	ENSMUSG00000010830	8.3	0.282326253420311	0
Lims1	LIM and senescent cell antigen-like domains 1	ENSMUSG00000019920	7.7	0.161494883198318	0
Lox	lysyl oxidase	ENSMUSG00000024529	17.4	0.60701466058186	0
Ltb4dh	leukotriene B4 12-hydroxydehydrogenase	ENSMUSG00000028378	15.8	0.8984950654471	0
Moesin	moesin	ENSMUSG000000031207	16	0.788883361967872	0
Msrb3	methionine sulfoxide reductase B3	ENSMUSG000000051236	12.3	0.00102496321528789	2
Nid2	nidogen 2	ENSMUSG00000021806	17.5	0.90558079225963	0
Nptx2	neuronal pentraxin 2	ENSMUSG000000059991	9.2	0.175861891060989	1
P4ha1	procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha 1 polypeptide	ENSMUSG000000019916	11.1	0.48626557682092	0
Pcolce	procollagen C-endopeptidase enhancer protein	ENSMUSG00000029718	16.6	0.81648288938779	0
Pcp41	Purkinje cell protein 4-like 1	ENSMUSG00000038370	9.4	0.294065803199054	0
Pdlim5	PDZ and LIM domain 5	ENSMUSG00000028273	10.3	0.849279929009718	0
Pkp2	plakophilin 2	ENSMUSG00000041957	8.9	0.732329016603611	0
Pla2g4a	phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)	ENSMUSG00000056220	12	0.588171263340715	0
Plekha4	pleckstrin homology domain containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 4	ENSMUSG000000040428	12.2	0.831917833283666	0
Plekha1	pleckstrin homology domain containing, family F (with FYVE domain) member 1	ENSMUSG000000051425	14.1	0.537285218252421	0
Postn	periostin, osteoblast specific factor	ENSMUSG00000027750	8.1	0.388402908906439	0
Prkcdbp	protein kinase C, delta binding protein	ENSMUSG000000037060	11.8	0.473481216897251	0
Psmb8	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 8 (large multifunctional peptidase 7)	ENSMUSG000000024338	8.4	0.240291370523193	0
Ptger4	prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)	ENSMUSG00000039942	7.4	0.0169656261146051	2
Ptgs2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	ENSMUSG000000032487	16.7	0.0664982218994861	1
Rab31	RAB31, member RAS oncogene family	ENSMUSG000000066515	9.7	0.376431775665229	0
Ramp1	receptor (calcitonin) activity modifying protein 1	ENSMUSG000000034353	12.7	1	0
Rhoj	ras homolog gene family, member J	ENSMUSG000000046768	12.5	0.0466051649540721	2
Rnf14	ring finger protein 14	ENSMUSG000000060450	8.6	0.682827286134272	0
Rras	Harvey rat sarcoma oncogene, subgroup R	ENSMUSG000000038387	10.7	0.413168429919227	0
S100a6	S100 calcium binding protein A6 (calcyclin)	ENSMUSG00000001025	14.6	0.56339670852537	0
Sdc4	syndecan 4	ENSMUSG000000017009	12	0.325596190236812	0
Serpine1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1	ENSMUSG000000037411	12	0.68138325295305	0
Sertad1	SERTA domain containing 1	ENSMUSG000000008384	7.1	0.998512821610342	0
Slc25a18	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier), member 18	ENSMUSG00000004902	14.6	0.914416812828998	0
Slc43a1	solute carrier family 43, member 1	ENSMUSG000000027075	8.5	0.119425691204641	2
Slit2	Slit-like 2 (Drosophila)	ENSMUSG000000039646	8.3	0.963754752625531	0
Sox4	SRY-box containing gene 4	ENSMUSG000000076431	24.2	1	0
Syt12	synaptotagmin-like 2	ENSMUSG000000030616	8.9	0.637005043954152	0
Tagln	transgelin	ENSMUSG000000032085	21.6	0.00137120574908911	3
Tagln2	transgelin 2	ENSMUSG000000026547	17.7	0.50934740239903	0
Tbx18	T-box18	ENSMUSG000000032419	25.6	0.241586720103998	0
Tgfb3	transforming growth factor, beta 3	ENSMUSG000000021253	7.8	0.00628544953530086	2
Thbs1	thrombospondin 1	ENSMUSG000000040152	13.4	0.024740964942078	2
Timp1	tissue inhibitor of metalloproteinase 1	ENSMUSG000000001131	35.1	0.440418549480707	0
Tm4sf1	transmembrane 4 superfamily member 1	ENSMUSG000000027800	7.1	0.64995586583253	0
Tnfrsf12a	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a	ENSMUSG000000023905	9.8	0.470998638047554	0
Tpm1	tropomyosin 1, alpha	ENSMUSG000000032366	16	0.0770149557002796	0
Tpm2	tropomyosin 2, beta	ENSMUSG000000028464	35	0.1567902483894	1
Trim25	tripartite motif protein 25	ENSMUSG00000000275	7.5	0.338505185718512	0
Usp18	ubiquitin specific peptidase 18	ENSMUSG000000030107	6.7	0.99959788490644	0
Vamp5	vesicle-associated membrane protein 5	ENSMUSG000000055545	10	0.347096864834484	0
Wisp1	WNT1 inducible signaling pathway protein 1	ENSMUSG000000005124	10.6	0.496072885683564	0

WT VP16 down

Gene Symbol	Full name	Ensemble number	factor	SRF affinity	cons. hits #
Apc2	adenomatosis polyposis coli 2	ENSMUSG00000020135	9.5	0.48811788127895	0
Arrgap28	Rho GTPase activating protein 28	ENSMUSG000000024043	4.8	0.998462194551064	0
Atp1a2	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 2 polypeptide	ENSMUSG00000007097	5.6	0.282881778035482	0
Bai2	brain-specific angiogenesis inhibitor 2	ENSMUSG000000028782	6.6	0.621307737056155	0
Bcas1	breast carcinoma amplified sequence 1	ENSMUSG00000013523	5.9	0.0660444299953507	1
Bin1	bridging integrator 1	ENSMUSG000000024381	6.9	0.357827214669177	0
Capn5	calpain 5	ENSMUSG00000035547	6	0.55418458728254	0
Cntn2	contactin 2	ENSMUSG000000053024	5	0.695144087311954	0
Coro7	coronin 7	ENSMUSG00000039637	3.2	0.792692524014554	0
Csk	c-src tyrosine kinase	ENSMUSG00000032312	4.5	0.998402541844024	0
Fbf1	Fas (TNFRSF6) binding factor 1	ENSMUSG00000020776	3.3	0.640713354233871	0
Fcho1	FCH domain only 1, mRNA (cDNA clone MGC:38225 IMAGE:5323527)	ENSMUSG00000070000	8.1	1	0
Grik5	glutamate receptor, ionotropic, kainate 5 (gamma 2)	ENSMUSG00000003378	4.9	0.894052881976973	0
Gse1	genetic suppressor element 1	ENSMUSG00000031822	4.6	0.69578140588679	0
Kcnc1	potassium voltage gated channel, Shaw-related subfamily, member 1	ENSMUSG000000040066	4.1	0.90770594848325	0
L1cam	L1 cell adhesion molecule	ENSMUSG000000031391	7.2	0.409569748846739	0
Lmyc1	lung carcinoma myc related oncogene 1	ENSMUSG00000028654	4.1	0.873954152768717	0
Mbp	myelin basic protein	ENSMUSG000000041607	19.3	0.888259718517387	0
Mid1	midline 1	ENSMUSG00000035299	11.1	0.577873618675031	0
Mppd1	metallophosphoesterase domain containing 1	ENSMUSG000000041708	4.7	0.11435584811331	1
Nkd2	naked cuticle 2 homolog (Drosophila)	ENSMUSG000000021567	3.2	0.392757910012039	0
Pkn1	protein kinase N1	ENSMUSG000000057672	3.6	0.933250046601679	0
Plp1	proteolipid protein (myelin) 1	ENSMUSG000000031425	6.5	0.00889358477932778	2
Plxna3	plexin A3	ENSMUSG000000031398	4.8	0.00202930227997267	2
Pou3f2	POU domain, class 3, transcription factor 2	ENSMUSG000000052621	4	0.73348356048389	0
Ptpkr	protein tyrosine phosphatase, receptor type, K	ENSMUSG00000019889	4.8	0.430230850533322	1
Rgma	RGM domain family, member A	ENSMUSG000000070509	4.2	1	0
Rusc2	RUN and SH3 domain containing 2	ENSMUSG00000035969	4.9	0.303039963405466	0
Ryr1	ryanodine receptor 1, skeletal muscle	ENSMUSG00000030592	18.1	0.824146417942371	0
Sema6c	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6C	ENSMUSG00000038777	6.2	0.999045520313937	0
Sez6	seizure related gene 6	ENSMUSG00000000632	6.4	0.449521760046369	1
Sh2d5	SH2 domain containing 5	ENSMUSG000000045349	6.8	0.655990323903394	0
Sla	src-like adaptor	ENSMUSG00000022372	4.8	0.925646329419492	0
Slc6a11	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 11	ENSMUSG00000030307	3.8	0.279699245447422	0
Slc5a1	solute carrier organic anion transporter family, member 5A1	ENSMUSG000000025938	3.2	0.00787140053314928	2
Snrp70	U1 small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A	ENSMUSG000000063511	5.7	0.807381349899011	0
Stk32b	serine/threonine kinase 32B	ENSMUSG000000029123	4.1	0.448542244858563	0
Ulk1	Unc-51 like kinase 1 (C. elegans)	ENSMUSG00000029512	4.3	0.869618371174187	0
Unc5a	unc-5 homolog A (C. elegans)	ENSMUSG000000025876	5.6	0.970112856989699	0
Xist	inactive X specific transcripts	ENSMUSG000000072485	2.3	1	0
Zfp316	zinc finger protein 316	ENSMUSG000000046658	5.1	1	0

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

Microarrays

Detailed information on probe generation and further processing are available under: http://www.weigelworld.org/resources/microarray/AtGenExpress/AtGE_probe_synthesis.pdf. RNA was hybridized to the Affymetrix mouse 430 2.0 microarray. We normalized data using gcRMA implemented in GeneSpring 7.1 (Agilent Technologies). Differentially expressed genes were identified using the Rank Product package implemented in R (www.R-project.org). Percentage false positives (pfp) were calculated based on 100 permutations. Only probe sets with a pfp ≤ 0.05 were carried forward.

Bioinformatics

To determine which of the differentially expressed genes are likely direct targets of SRF we followed two complementary approaches. First, we identified potential CArG-box binding sites, which are conserved between mouse and human or any of the more distant species (chicken, fugu, ciona intestinalis). To this end we used the orthology assignment and transcription start sites from ENSEMBL¹. We identified conserved non-coding blocks in the 5kb upstream region and 1kb downstream region for each pair of orthologous genes. For the pairwise alignment we used BLASTZ, which defines evolutionary conserved regions in the mouse genome. We annotated these regions using the consensus motif, SRF_C, from the TRANSFAC database², and a motif finding algorithm as suggested by³. In this statistical approach, potential binding sites are identified if the score exceeds the threshold score at which the false positive rate balances the false negative rate. Being conserved, such binding sites suggest functionality and therefore support the claim of direct SRF regulation.

In a second approach, we followed a biophysical framework and calculated the binding affinities of SRF to promoter regions of genes. This model has recently been introduced and calibrated⁴. It avoids any cutoff and instead provides a ranking of different promoter regions according to the binding strength of a transcription factor with a known motif description. For our purposes, we took the SRF motif matrix from TRANSFAC as before. But, rather than calculating the SRF-affinity for the whole promoter region (-5kb, +1kb), we only calculated the affinity over all conserved blocks, which may be considered functional. In essence, this allows a more refined quantification of the SRF binding potential than a simple determination of conserved binding sites, which may still differ widely with respect to their binding strength. Furthermore, we also normalized the predicted conserved affinities to provide a comparable measure for promoter regions with different degree of conservation and to give a statistical interpretation of binding strength. As a background we used the distribution of affinities over all promoters. For each promoter we obtained a p-value, which is small if the binding affinity of SRF is large. Details for promoter structures and SRF binding affinities can be obtained under <http://promotion.molgen.mpg.de/cgi-bin/gbrowse/M.musculus/>.

Immunocytochemistry

We fixed cultures (4% PFA/5% Sucrose/PBS) followed by permeabilization (0.1% Triton/PBS) and blocking in 2% BSA/PBS. First antibodies included: mouse α - β -Tubulin (1:5000; Sigma), rabbit α -MBP (1:2000; Covance), mouse α -CNPase (1:1000; Sigma), rabbit α -OLIG2 (1:750; Chemicon), rabbit α -VP16 (1:2000; Abcam) and rabbit α -SRF (1:1000; Santa Cruz). First antibodies were detected by Alexa-

conjugated secondary antibodies (1:1500; Molecular Probes) along with Alexa647-conjugated Phalloidin (1:200).

Histology

We fixed mice with 4% PFA/PBS followed by over-night post-fixation in the same solution. 50 μ m vibratome sections were incubated as follows: mouse α -NFAP (1:25; clone 3A10, DSHB), mouse α -APP (1:100; Chemicon), mouse α -GFAP (1:1000; Sigma), rabbit α -MBP (1:1000–1:10000), rabbit α -PLP (1:1000; a kind gift of Dr. KA Nave, MPI Göttingen, Germany⁵), rabbit α -SRF (1:1000), rabbit α -Cre (1:1000; BD), rabbit α -NG2 (1:400; Chemicon), mouse anti-GFP (1:3000; Roche) mouse α - β III Tubulin (1:500; Covance), rabbit α -PDGFR α (1:100; Neomarkers), rabbit α -OLIG1 (1:1000; Chemicon), guinea pig α -SOX10 (1:1000; kindly provided by Dr. M. Wegner, University of Erlangen, Germany⁶), rabbit α -Aldh1L1 (1:1000; kindly provided by Dr. S. Krupenko, Medical University of South Carolina, USA⁷), mouse α -SMI32 (1:500; Sternberger), rabbit α -IBA-1 (1:500; Wako), rabbit α -OLIG2 (1:1000) and goat α -CTGF (1:1000; Santa Cruz). Detection of first antibodies involved Alexa- or Biotin-conjugated secondary antibodies followed by the ABC system (Vectastain) and DAB as substrate.

A detailed protocol for PAS staining can be obtained upon request.

Transmission electron microscopy

Mice were perfused with 2.5% glutaraldehyde, 2.5% PFA in PBS. Vibratome sections of 500 μ m were post-fixed with 1% osmium tetroxide in 100 mM PO₄ buffer pH 7.2 for 1 h on ice, washed with H₂O, treated with 1% aqueous uranyl acetate for 1 h at 4°C, dehydrated through a graded series of ethanol, washed with propylene oxide as an intermedium, then infiltrated with propylene oxide/resin mixtures and finally embedded in Epon (using glycidether 100). Ultrathin sections were collected on coated slot grids, stained with uranyl acetate and lead citrate and viewed in a TECnai G² electron microscope.

qRT-PCR analysis

We isolated total RNA with the RNeasy kit (Qiagen). Reverse transcription was performed with 1 μ g RNA using Reverse transcriptase (Promega) and random hexamers. qPCR was performed on ABI PRISM 7700 Sequence Detector with the Power PCR SYBR green PCR master mix (ABI). Expression was determined in relation to *Gapdh* RNA levels. Primer sequences can be obtained upon request.

Biochemistry

We prepared lysates in 100 mM Tris pH 7.8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS and protease inhibitors (Roche). Samples were resolved on 10-12% SDS- or 16% Tricine-SDS-PAGE followed by transfer on PVDF membranes (Amersham). After blocking, first antibodies were applied overnight at 4°C: rabbit anti-MOBP (1:1000; gift of Dr A. Holz, TU Braunschweig, Germany⁸), mouse anti-MOG (1:200; gift of Drs Linington and Gardinier), rabbit anti-PLP (1:1000;⁵), rabbit anti-OLIG2 (1:2500; Chemicon), rabbit anti-MBP (1:1000; Covance), mouse anti-GFAP (1:400; Sigma), mouse anti-GAPDH (1:30000), mouse anti-CNPase (1:500; Sigma) and goat anti-MAG (1:500, R&D systems). Detection of first antibodies involved horseradish-peroxidase conjugated secondary antibodies (1:5000) and the ECL Western Blotting Substrate (Pierce).

Molecular Biology

For reporter gene assays 2×10^5 HEK293 or embryonic stem cells/well (24-well plate) grown in DMEM/10% FCS were transfected with Promofectin (Promokine) as follows: 0.25 μg SRF-VP16 DNA (or SRF-VP16 Δ MADS), 0.05 μg β -gal expression plasmid, 0.2 μg luciferase reporter plasmid and 0.3 μg puc vector DNA. *Pip*- and *Mbp*^a-construct were gifts of Drs. Nave (MPI, Göttingen) and Wegner (University of Erlangen), respectively. The *Ctgf*-Luciferase was a kind gift of Dr D. Abraham (UCL, London, UK) and Dr M. Goppelt-Struebe (University of Erlangen). 24–48 h after transfection, luciferase activity was normalized to β -gal.

For CHIP with P14 mouse brains we followed a protocol by Nelson⁹ employing 5 μg of rabbit anti-SRF or control IgG antibody. 1–2 μl of immunoprecipitated or input DNA was used for qPCR, followed by normalization to input DNA. Primer sequences are obtainable upon request.

For construction of an SRF-engrailed fusion protein, we used a pcDNA3-based vector backbone kindly provided by Dr. A. Sharrocks (University of Manchester, UK) containing amino acid 2–298 of the engrailed repressor domain and a FLAG-epitope¹⁰. We used the following primers to PCR amplify homo sapiens *Srf*: sense (5' CCC AAG CTT ATG TTA CCG ACC CAA GC 3') and antisense (5' CCG CTC GAG TTC ACT CTT GGT GCT GTG 3'). Expression of SRF-engrailed was verified using anti-FLAG immunocytochemistry and western blotting. For luciferase assays in HEK293 cells (see above), 30–300 ng SRF-engrailed and/or 7.5–30 ng SRF-VP16 were used per well. Cortical neurons were electroporated with 3 μg of SRF-engrailed followed by RNA isolation 24h later.

SUPPLEMENTARY REFERENCES

1. Hubbard, T., *et al.* Ensembl 2005. *Nucleic acids research* **33**, D447-453 (2005).
2. Matys, V., *et al.* TRANSFAC: transcriptional regulation, from patterns to profiles. *Nucleic acids research* **31**, 374-378 (2003).
3. Rahmann, S., Muller, T. & Vingron, M. On the power of profiles for transcription factor binding site detection. *Statistical applications in genetics and molecular biology* **2**, Article7 (2003).
4. Roider, H.G., Kanhere, A., Manke, T. & Vingron, M. Predicting transcription factor affinities to DNA from a biophysical model. *Bioinformatics (Oxford, England)* **23**, 134-141 (2007).
5. Jung, M., Sommer, I., Schachner, M. & Nave, K.A. Monoclonal antibody O10 defines a conformationally sensitive cell-surface epitope of proteolipid protein (PLP): evidence that PLP misfolding underlies dysmyelination in mutant mice. *J Neurosci* **16**, 7920-7929 (1996).
6. Maka, M., Stolt, C.C. & Wegner, M. Identification of Sox8 as a modifier gene in a mouse model of Hirschsprung disease reveals underlying molecular defect. *Developmental biology* **277**, 155-169 (2005).
7. Krupenko, S.A. & Oleinik, N.V. 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase, one of the major folate enzymes, is down-regulated in tumor tissues and possesses suppressor effects on cancer cells. *Cell Growth Differ* **13**, 227-236 (2002).
8. Holz, A. & Schwab, M.E. Developmental expression of the myelin gene MOBP in the rat nervous system. *Journal of neurocytology* **26**, 467-477 (1997).
9. Nelson, J.D., Denisenko, O. & Bomsztyk, K. Protocol for the fast chromatin immunoprecipitation (ChIP) method. *Nat Protoc* **1**, 179-185 (2006).
10. Vickers, E.R. & Sharrocks, A.D. The use of inducible engrailed fusion proteins to study the cellular functions of eukaryotic transcription factors. *Methods (San Diego, Calif)* **26**, 270-280 (2002).
11. Philippar, U., *et al.* The SRF Target Gene Fhl2 Antagonizes RhoA/MAL-Dependent Activation of SRF. *Mol Cell* **16**, 867-880 (2004).
12. Sun, Q., *et al.* Defining the mammalian CArGome. *Genome research* **16**, 197-207 (2006).

A Nuclear Actin Function Regulates Neuronal Motility by Serum Response Factor-Dependent Gene Transcription

Sina Stern,¹ Evaine Debre,¹ Christine Stritt,¹ Jürgen Berger,² Guido Posern,³ and Bernd Knöll¹

¹Neuronal Gene Expression Laboratory, Department of Molecular Biology, Interfaculty Institute for Cell Biology, Eberhard Karls University Tübingen, and

²Microscopy Unit, Max Planck Institute for Developmental Biology, 72076 Tübingen, Germany, and ³Department of Molecular Biology, Max Planck Institute of Biochemistry, 82152 Martinsried, Germany

Neuronal motility relies on actin treadmilling. In addition to regulating cytoskeletal dynamics in the cytoplasm, actin modulates nuclear gene expression. We present a hitherto unappreciated cross talk of actin signaling with gene expression governing neuronal motility. Toward this end, we used a novel approach using mutant actins either favoring (G15S) or inhibiting (R62D) F-actin assembly. Overexpressing these mutant actins in mouse hippocampal neurons not only modulated growth-cone function but also neurite elongation, which was ambiguous by traditional pharmacological interference. G15S actin enhanced neurite outgrowth and filopodia number. In contrast, R62D reduced neurite length and impaired growth-cone filopodia formation. Growth-cone collapse induced by ephrin-As, a family of repulsive axon guidance molecules, is impaired upon R62D expression, resulting in perseverance of ring-shaped F-actin filaments. R62D-induced phenotypes strongly resemble neurons lacking SRF (Serum Response Factor). SRF controls gene transcription of various actin isoforms (e.g., *Actb*, *Acta1*) and actin-binding proteins (e.g., *Gsn*) and is the archetypical transcription factor to study actin interplay with transcription. We show that neuronal motility evoked by these actin mutants requires SRF activity. Further, constitutively active SRF partially rescues R62D-induced phenotypes. Conversely, actin signaling regulates neuronal SRF-mediated gene expression. Notably, a nucleus-resident actin (R62D^{NLS}) also regulates SRF's transcriptional activity. Moreover, R62D^{NLS} decreases neuronal motility similar to the cytoplasmic R62D actin mutant although R62D^{NLS} has no access to cytoplasmic actin dynamics. Thus, herein we provide first evidence that neuronal motility not only depends on cytoplasmic actin dynamics but also on the availability of actin to modulate nuclear functions such as gene transcription.

Introduction

During brain development, neurons pass through various phases of morphological differentiation encompassing neurite elongation, neurite differentiation in axon and dendrites, and directional navigation of growth cones toward postsynaptic targets. Actin is a key cytoskeletal component involved in many of these processes (Dent and Gertler, 2003; Pak et al., 2008). Filamentous F-actin, enriched in growth cones, is instrumental for sculpting growth-cone shape and processing of directional information by guidance cues (Gallo and Letourneau, 2004; Kalil and Dent, 2005). Contrastingly, the evidence for actin function in neurite elongation, mostly by using pharmacological inhibitors, is conflicting and here microtubules are thought to confer the driving elongation force (Dent and Gertler, 2003; Pak et al., 2008).

In addition to regulation of cytoplasmic cytoskeletal dynam-

ics, a little appreciated property of actin signaling is modulation of gene expression so far only reported for non-neuronal cells. Actin modulates the transcriptional machinery by a nuclear-resident pool (Grummt, 2006) or by controlling nuclear translocation of MAL (MTRF-A), a Myocardin family transcription factor (Pipes et al., 2006; Posern and Treisman, 2006). In non-neuronal cells, F-actin polymerization favors MAL nuclear import, whereas G-actin prevents translocation (Miralles et al., 2003; Kuwahara et al., 2005; Vartiainen et al., 2007). Nuclear MAL cooperates with Serum Response Factor (SRF), which is a key event during cellular differentiation of many processes (Posern and Treisman, 2006; Miano et al., 2007). SRF activity is regulated by actin/MAL interaction and in turn, SRF transcriptionally controls many genes encoding Actin isoforms (*Actb*, *Actg*, *Acta2*) and actin-binding proteins (ABPs; e.g., *Gsn*) (Posern and Treisman, 2006; Sun et al., 2006). Recently, *Srf* mouse mutants revealed SRF's crucial function during cell migration, neurite outgrowth, axonal pathfinding, and synapse function (Alberti et al., 2005; Ramanan et al., 2005; Etkin et al., 2006; Knöll et al., 2006; Wickramasinghe et al., 2008).

Here we analyzed neuronal actin signaling by a novel approach using actin mutant isoforms known to favor or preclude actin polymerization. The actin mutants G15S and S14C favor F-actin assembly, yet differ with regard to their ABP interaction. S14C unlike G15S binds to e.g., the actin-severing protein Cofilin (Posern et al., 2004; Sarmiere and Bamberg, 2004). In opposite to

Received Jan. 21, 2009; revised Feb. 26, 2009; accepted March 9, 2009.

B.K. is supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft Emmy Noether program, SFB 446, the Schram-Stiftung, and young investigator grants from Tübingen University. We thank Sofia Anastasiadou for excellent work during her laboratory rotation. Daniela Sinske provided excellent technical help throughout. We thank A. Wizenmann for discussions on the manuscript.

The authors declare no competing financial interests.

Correspondence should be addressed to Bernd Knöll, Neuronal Gene Expression Laboratory, Department of Molecular Biology, Interfaculty Institute for Cell Biology, Eberhard-Karls-University Tübingen, Auf der Morgenstelle 15, 72076 Tübingen, Germany. E-mail: bernd.knoell@uni-tuebingen.de.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.0333-09.2009

Copyright © 2009 Society for Neuroscience 0270-6474/09/294512-07\$15.00/0

G15S and S14C, R62D is excluded from F-actin thereby increasing monomeric G-actin (Posern et al., 2002, 2004). Employing these actin mutants, we uncovered a function for actin signaling in growth-cone motility modulated by ephrin-A guidance cues. Moreover these actin mutants affect neurite elongation, an actin function which by pharmacological actin interference was ambiguous. We demonstrate that actin-dependent modulation of the cytoskeleton requires nuclear SRF gene activity, as revealed by *Srf*^{-/-} neurons. Conversely, cytoplasmic (R62D and G15S) and nuclear (R62D^{NLS}) neuronal actin control SRF activity. Notably, R62D actin (cytoplasmic and nuclear) phenocopies SRF-deficient neuronal morphology providing evidence for an intricate cross talk of the nuclear and cytoplasmic compartment to shape neuronal morphology.

Materials and Methods

Neuronal cultures. For conditional *Srf* mutants, see Alberti et al. (2005) and Knöll et al. (2006). P1–P2 hippocampal neurons were cultured on PLL/laminin-coated coverslips in NMEM/B27 medium for 1–2 d. Electroporation was performed with 3 μ g of DNA (either actin mutant, or, as control, GFP or empty vector; Amaxa). For growth-cone collapse, cultures were incubated for 30 min at 37°C with 1 μ g/ml ephrin-A5-Fc (R&D Systems) or Fc preclustered for 30 min at room temperature (rt) with 10 μ g/ml anti-human IgG Fc-specific antibodies.

Immunocytochemistry. We used mouse anti-FLAG (1:300; Sigma), rabbit anti-SRF (1:100; Santa Cruz), rabbit anti-MAL [a gift from Dr. R. Treisman, Cancer Research UK, London, UK], and rabbit anti-MAP2 antibodies (1:500; Millipore Bioscience Research Reagents). Texas-red or Alexa660-conjugated phalloidin (1:100, Invitrogen) was applied along with secondary Alexa488-, Alexa546-, or Alexa660-conjugated antibodies (1:1000). Images were recorded on a confocal microscope (Zeiss Axiovert 200 M) using Zeiss AxioCam and Axiovision software and processed using Adobe Photoshop. Objectives included 20 \times /0.8 Plan-Apochromat, 40 \times /1.3 Plan-Neofluar, 63 \times /1.4 Plan-Apochromat, and 100 \times /1.3 Plan-Neofluar.

Electron microscopy. Cultures were pretreated in PEM buffer (100 mM PIPES, pH 6.8, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂) including 1% Triton X-100, 4.2% sucrose, 10 mM taxol, 10 mM phalloidin, and 0.2% glutaraldehyde for 4.5 min. Subsequently, cultures were washed for 5 min in PEM containing 1 mM taxol, 1 mM phalloidin, and 1% sucrose followed by fixation for 15 min with 2% glutaraldehyde/1% sucrose in 0.1 M sodium-cacodylate buffer, pH 7.3. After three PBS washes, we followed a published protocol (Svitkina and Borisy, 1998). The final rotary-shadowing was replaced with platinum and carbon by sputter coating with a 4 nm layer of gold-palladium. Cells were treated with 0.1% tannic acid in H₂O at rt for 20 min, washed with H₂O, and incubated with 0.1% aqueous uranyl acetate at 4°C for 20 min. After dehydration in a graded ethanol series, samples were critical-point-dried from CO₂, sputter coated with a layer of 4 nm gold/palladium (Bal-Tec MED 010), and examined at 20 kV accelerating voltage in a Hitachi S-800 field emission scanning electron microscope.

Reporter gene assay. We used 2 \times 10⁵ P2–P5 cerebellar neurons/well of a 24-well plate grown in NMEM/B27 medium overnight. Cells were transfected with Lipofectamine (Invitrogen) in OPTIMEM (Invitrogen) for 4 h according to manufacturer. We used 0.45 μ g of SRF reporter gene construct (3DA.Luc) (Posern et al., 2002), 0.1 μ g of β -galactosidase vector, 0.1–0.8 μ g of actin expression vector, and 4 ng of SRF-VP16 (Schratt et al., 2002) per transfection. Luciferase activity was normalized to galactosidase 24 h after transfection.

Rho activity assay. We used the Rhotekin-GST (Reid et al., 1996) (a gift from I. Just, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover, Germany) to pull down active GTP-bound Rho. Rho-GST was bacterially expressed and purified via glutathione Sepharose (Bio-Rad). Lysates of P14 wild-type and *Srf* mutant cortices were incubated with the Rho-GST beads for 30 min at 4°C. Samples were resolved by 12.5% SDS-PAGE and blotted with an antibody recognizing RhoA, RhoB, and RhoC (Millipore).

Biochemistry. Lysates of mock-electroporated E17 cortical neurons or

electroporated with 3 μ g of R62D or R62D^{NLS} were analyzed using goat anti-MAL (1:1500; Santa Cruz), rabbit anti-MAL (a kind gift from Dr. R. Treisman), or rabbit anti-SRF antibodies (1:500; Santa Cruz). Lysis buffer consisted of 50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 1 mM sodium-vanadate, 1 mM sodium-fluoride, 1 mM sodium pyrophosphate, and 1 \times protease inhibitor (Roche).

Statistics. For neurite length the largest distance between neurites of one neuron was measured using Axiovision software. For growth-cone collapse, all growth cones of one neuron were scored: for percentage of full-growth-cone collapse, see Figure 3B as reference; for F-actin rings see Figure 3J as reference. Statistical analysis was performed using two-tailed *t* test with *, **, and *** indicating *p* < 0.05, 0.01, and 0.001, respectively. Error bars represent SD.

Results

SRF regulates growth-cone filopodia and filament bundling in neurites

We used platinum replica electron microscopy (EM) (Svitkina and Borisy, 1998) to uncover novel SRF-evoked neuronal morphological alterations. Neurons were directly subjected to EM (Fig. 1A, B, E, F, I, J, M, N) or simultaneously fixed and stabilized, while extracting soluble components. The latter allowed detailed views on the cytoskeleton underlying the plasma membrane (Fig. 1C, D, G, H, K, L, O, P).

Wild-type neurons elaborated several neurites terminated by growth cones with many veil-like lamellipodia and finger-like filopodia (Fig. 1A, C, K, I). Induction of growth-cone collapse by the repulsive axon guidance molecule ephrin-A5 (Knöll and Drescher, 2002; Pasquale, 2005) resulted in break down of the growth-cone cytoarchitecture (Fig. 1B, D, J, L). Ephrin-A addition in *Srf* mutants (Fig. 1F, H, N, P) did not collapse growth cones yet retained ring-like filaments consisting of both F-actin and microtubules as before (Knöll et al., 2006). *Srf*^{-/-} neurons (Fig. 1E–H) were shortened and growth-cone area almost equaled the cell-body area (Fig. 1E–H) (Knöll et al., 2006).

Here we report for the first time an almost complete lack of filopodia in *Srf*^{-/-} growth cones (Fig. 1E–H). In fact, growth-cone borders appeared sharp producing a rather precise curvature (Fig. 1O, arrows). In wild type, filaments frequently ran from the center to the periphery entering filopodia (Fig. 1K). In *Srf* mutants (Fig. 1O), filaments were unable to form distinct filopodia indicating that lamellipodial networks take over interspaces which are cleared in wild type. Also, wild-type plasma membrane contained ruffles and vesicular-like structures (Fig. 1J, inset), which were absent in SRF-deficient neurons (Fig. 1M, N, insets). In wild-type neurites, filaments were bundled (Fig. 1C, D, K, L, arrows), whereas in *Srf* mutants, the neurite shaft lacked filament compaction (Fig. 1G, H, O, P, arrows).

Actin modulates neuronal morphology in an SRF-dependent manner

SRF is the archetypical transcription factor for studying actin interplay with gene expression (Posern and Treisman, 2006; Miano et al., 2007). Hence we asked, how interfering with actin treadmill affects neuronal architecture and to what extent actin signaling requires SRF activity. For this, we used actin point mutations such as G15S and S14C favoring F-actin polymerization. R62D actin instead cannot be incorporated into F-actin, thereby raising G-actin levels (Posern et al., 2002, 2004).

First, we assessed neurite outgrowth upon actin mutant overexpression (Fig. 2 and supplemental Fig. 1, 3, available at www.jneurosci.org as supplemental material). In wild-type neurons

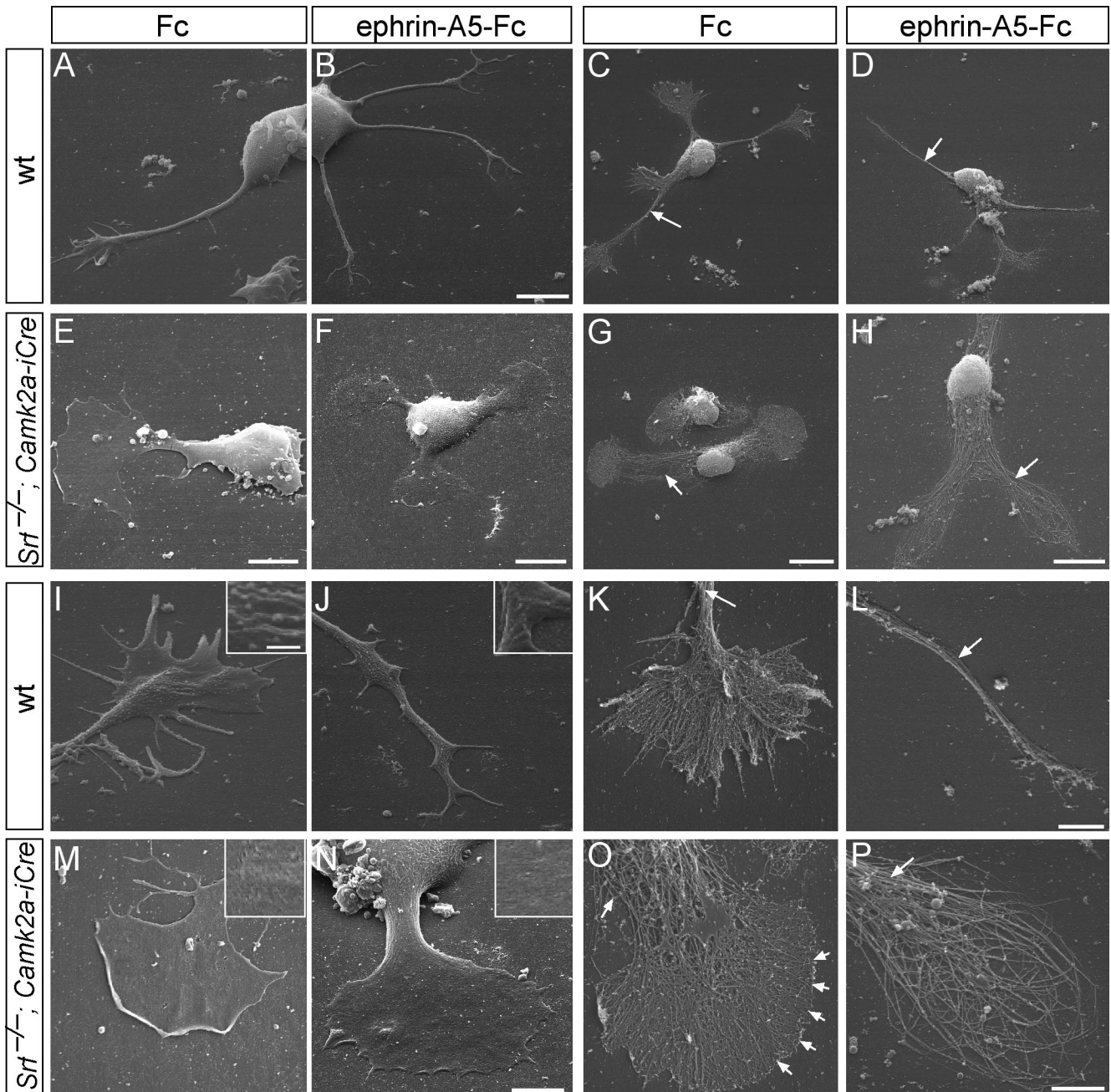


Figure 1. Growth-cone inflation and absence of filopodia in SRF-deficient neurons. Neurons were fixed (*A, B, E, F, I, J, M, N*) or peeled off the plasma membrane (*C, D, G, H, K, L, O, P*) followed by platinum replica EM. *A–D*, Wild-type neurons protruded multiple long neurites terminated by growth cones with several filopodia (*A, C*), which after ephrin-A treatment collapsed (*B, D*). Note the tight filament bundling in the neurite shaft (*C, D*, arrows). *E–H*, *Srf*^{−/−} neurons were stunted in growth, typically bipolar in shape and growth-cone area almost equaled cell-body area. Ephrin-A did not collapse growth cones (*F, H*) and produced ring-shaped filaments (*H*; see *P*). *I–L*, Wild-type growth cones contained filopodia separated by lamellipodia (*E, K*). Ephrin-A incubation reduced growth-cone complexity (*J, L*). Arrows in *K* and *L* point at tightly bundled filaments. The plasma membrane contained many ruffles and vesicle-like structure (*J, K*, insets). *M–P*, SRF-deficient growth cones (*M, O*) were rounded up and inflated with no distinguishable filopodia (*O*, arrowheads). Ephrin-A5 did not break down the cytoskeleton completely and resulted in ring-like filaments (*N, P*). Arrows in *O* and *P* point at loosened filament bundles. The plasma membrane appeared smooth (*M, O*, insets). Scale bars: *A, B*, 6 μ m; *C, D, G*, 10 μ m; *E*, 5 μ m; *F, H*, 8 μ m; *I–K, M–P*, 3 μ m; *L*, 2 μ m; insets, 500 nm.

G15S increased (Fig. 2C), S14C slightly reduced (Fig. 2E), and R62D strongly reduced (Fig. 2G) neurite length, compared with control (Fig. 2I). In keeping with G15S and S14C (Fig. 2C,E) favoring actin polymerization, both colocalized with phalloidin (recognizing F-actin). Contrastingly, R62D was largely excluded from the growth cone, thus accumulating complementarily to growth-cone F-actin in the neurite shaft and cell body [Figs. 2G (arrow), 3G; supplemental Figs. 1, 3, available at www.jneurosci.org as supplemental material]. Notably, wild-type neurons ex-

pressing R62D strongly phenocopy *Srf*^{−/−} neuron morphology (Fig. 2, compare G with B; Fig. 1). To test whether SRF is targeted by actin signaling, we asked, whether actin mutants can modulate neurite outgrowth in *Srf*^{−/−} neurons. Neither actin mutant affected neurite length in *Srf* mutants (Fig. 2D,F,H; see also Fig. 2I), suggesting that actin modulation required SRF activity. In fact, R62D appeared to enhance SRF-induced phenotypes (Fig. 2, compare H with B), as revealed by ring-like growth-cone structures normally only visible in *Srf* mutants upon ephrin-A addition (Fig. 3).

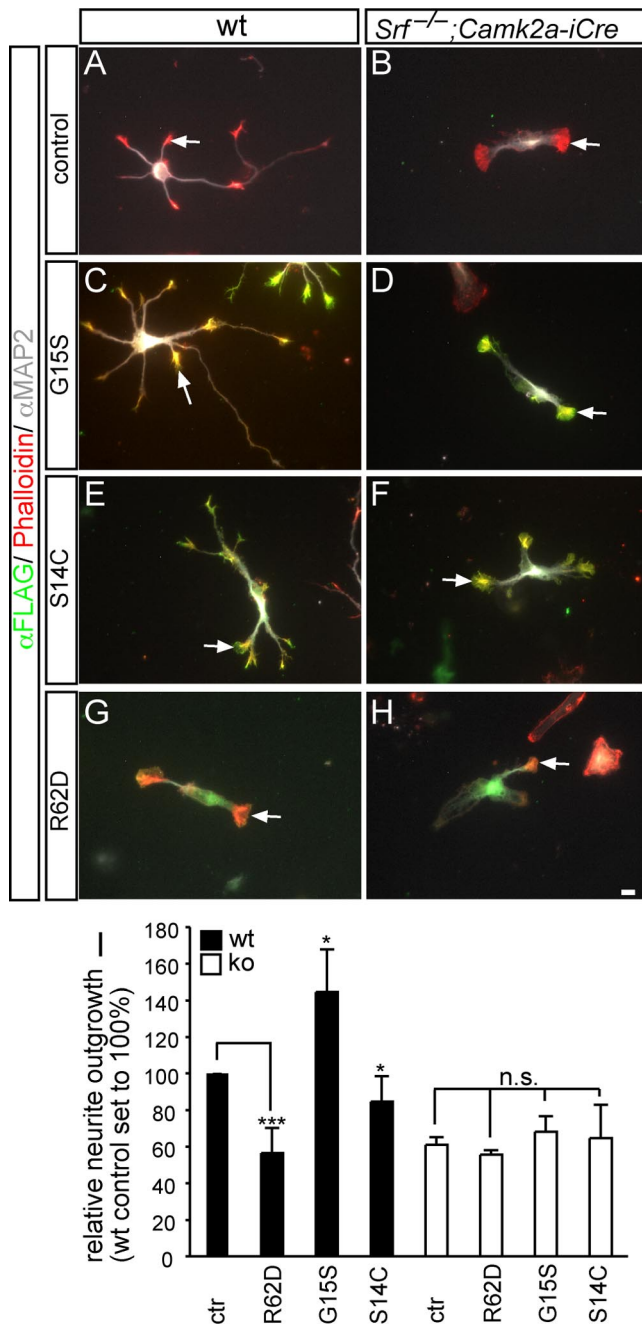


Figure 2. Actin signaling affects neurite outgrowth. Wild-type (*A, C, E, G*) or SRF-deficient (*B, D, F, H*) were stained for F-actin (phalloidin), anti-FLAG to visualize actin mutants, and anti-MAP2 antibodies (*C–H*). Arrows point at individual growth cones. *A, C, E, G*, Compared with mock-electroporated (*A*), G15S actin (*C*) increased and S14C (*E*) slightly and R62D (*G*) strongly decreased neurite length. In F-actin-stabilizing mutants G15S and S14C (*C, E*), FLAG and phalloidin staining merged. Contrastingly, R62D was mostly excluded from the F-actin-rich growth cone (*G*, arrow). Notably, R62D-expressing neurons (*G*) resembled SRF-deficient neurons (see *B, D, F, H*). *B, D, F, H*, SRF-deficient neurons (*B*) were shorter than wild-type neurons (see *A*). Actin signaling by G15S (*D*), S14C (*F*), or R62D (*H*) failed to rescue neurite length. *I*, Quantification of neurite length. The average neurite length of wild-type control electroporated neurons (see *A*) was set to 100%. Scale bar: (in *H*) *A–H*, 10 μ m.

R62D actin inhibits growth-cone filopodia formation

Next, we investigated the consequences of actin mutants on growth-cone morphology (Fig. 3). Wild-type growth cones contained filopodia and lamellipodia (Fig. 3*A*), a situation not altered by S14C (Fig. 3*E*). G15S increased filopodia number (ctr: 2.5 ± 0.3 filopodia/growth cone; G15S: 4 ± 0.7 ; $p < 0.05$) (Fig.

3*C*). R62D actin instead prevented filopodia formation in wild-type neurons (Fig. 3*G*) thus resembling *Srf*^{-/-} growth cones (Fig. 3*I*). Notably, R62D induced this growth-cone modification although being itself largely excluded from the growth cone and mainly remaining outside, in the neurite shaft (Fig. 3*G*). G15S and S14C localized to the growth cone (Fig. 3*C, E*). Ephrin-A5 addition to wild-type neurons resulted in growth-cone collapse and reduced F-actin content (Gallo et al., 2002; Pandithage et al., 2008) in control (Fig. 3*B*) and G15S- (Fig. 3*D*) and S14C- (Fig. 3*F*) expressing neurons (Fig. 3*Q*). Contrastingly, R62D blocked ephrin-A5 stimulated F-actin depolymerization and preserved F-actin rings reminiscent of *Srf*^{-/-} growth cones upon ephrin addition (Figs. 1*H, P, 3J*; quantified in Fig. 3*R*).

As with neurite length (Fig. 2), neither G15S (Fig. 3*K*) nor S14C (Fig. 3*M*) reconstituted filopodia formation in SRF-deficient neurons. R62D induced already in wild-type growth cones ring-like filaments upon ephrin-A5 treatment resembling *Srf*^{-/-} growth cones stimulated with ephrins (Fig. 3, compare *J, O*).

Nuclear and cytoplasmic actin signaling target neuronal gene expression

We showed above that actin requires SRF for modulating neuronal motility. Next we asked, whether actin itself modulates SRF-directed transcription in neurons (Fig. 4).

In SRF-dependent reporter gene assays with neurons R62D decreased, whereas G15S enhanced luciferase activity in line with non-neuronal cells (Posern et al., 2002, 2004). Contrastingly, S14C, incapable of binding the SRF cofactor MAL, did not stimulate neuronal SRF activity (Fig. 4*A*). Additionally, R62D reduced luciferase activity evoked by constitutively active SRF-VP16 (Fig. 4*B*) (Schratt et al., 2002).

Next, we investigated as to what extent actin shapes neuronal morphology by modulating gene expression in comparison to its cytoplasmic cytoskeletal function. In case R62D-induced phenotypes are not only exerted by modulating cytoplasmic actin dynamics but also by inhibition of SRF-directed gene activity, introduction of SRF-VP16 should be able to partially rescue these phenotypes (Fig. 4*C–F*). Indeed, SRF-VP16 strongly, but not completely, rescued R62D-decreased neurite length (Fig. 4*E*), in contrast to SRF-VP16 lacking the DNA-binding domain (SRF-VP16 Δ MADS, control) (Fig. 4*D, F*). To test more directly whether actin governs neuronal motility via modulating gene transcription, we used a nuclear-resident actin mutant containing a nuclear localization sequence (R62D^{NLS}). Indeed, R62D^{NLS} exclusively localized to the nucleus and had no access to cytoplasmic cytoskeletal dynamics. R62D^{NLS} similarly to cytoplasmic R62D (Fig. 2) decreased neurite length (Fig. 4*H*) (Ctr.: $131.3 \pm 7.5 \mu$ m; R62D^{NLS}: $71.3 \pm 3.8 \mu$ m; $p \leq 0.001$). Further, R62D^{NLS} growth cones (Fig. 4*H, J, L*) similarly to cytoplasmic R62D (Figs. 3*G, 4D*) did not protrude filopodia compared with control (Fig. 4*G, I*). Ephrin-A induced growth-cone collapse was also impaired in R62D^{NLS}-expressing neurons (Fig. 4*L*) compared with control (Fig. 4*K, M*; compare arrowheads). However, F-actin rings (Fig. 3*H*) were not as frequently observed as with cytoplasmic R62D. As with cytoplasmic R62D, R62D^{NLS} decreased SRF gene activity (Fig. 4*N*). We tested, whether SRF-VP16 could rescue R62D^{NLS}-decreased neurite length (Fig. 4*O*). Indeed, SRF-VP16 could fully rescue R62D^{NLS}-decreased neurite length (Fig. 4*O*) unlike the cytoplasmic R62D mutant (Fig. 4*C–F*). Thus, actin impinges on neuron morphology not only by cytoplasmic cytoskeletal dynamics, but also by a nuclear gene expression function.

Finally, we addressed how actin might exert its impact on gene expression. Both, cytoplasmic R62D and R62D^{NLS} modulated

expression of MAL (Fig. 4*P*). Expression of a 100 kDa MAL protein was suppressed by R62D^{NLS}, but not by cytoplasmic R62D. Strikingly, a MAL variant of ~65 kDa, which was most abundant in neurons, was consistently upregulated by both R62D and R62D^{NLS}. SRF expression in contrast was unaltered, as was full-length MAL. This is to our knowledge the first data on actin modulating protein level of a transcriptional regulator.

Discussion

Actin-dependent modulation of neuron morphology

Here we studied neuronal actin function by a novel approach using actin mutants rather than pharmacological interference. This strategy revealed that actin sculpts growth-cone morphology and modulates neurite length. Our data suggest that simply raising the F-actin content is not sufficient to increase neurite length, as G15S only and not S14C, which is likewise favoring F-actin assembly, increased neurite length (Fig. 2). This points at an important role of actin-associated molecules in which these actin mutants differ. G15S but not S14C acts independent of RhoA, a known neurite extension inhibitor (Knöll et al., 2006) whose activity is elevated in *Srf* mutants (supplemental Fig. 2, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Additionally, G15S does not, unlike S14C, bind to the actin-severing protein Cofilin (Posern et al., 2004; Sarmiere and Bamberg, 2004), whose activity is impaired in *Srf* mutants (Alberti et al., 2005). Therefore G15S incorporated into F-actin might protect from Cofilin severing, thereby increase filament stability and enhance neurite length and filopodia number (Figs. 2, 3). In opposite to G15S, R62D decreased neurite length and filopodia number (Figs. 2–4). R62D cannot be incorporated into F-actin and increases the free G-actin pool (Posern et al., 2002, 2004). We noted that R62D is largely excluded from the F-actin-rich growth cone (Figs. 2*G*, 3*G*, 4*C*). Thus, these two pools of spatially and functionally distinct actin might antagonize and thereby decrease neurite elongation. In sum, our data suggest that F-actin (not associated with e.g., RhoA and Cofilin; i.e., G15S) favors, whereas G-actin (R62D) antagonizes neurite outgrowth and growth-cone filopodia formation.

Actin modulates neuronal morphology by nuclear gene expression

A key finding of this report is that actin-directed neuronal motility is not only executed by modulating cytoplasmic microfilament dynamics but in concert with nuclear gene expression.

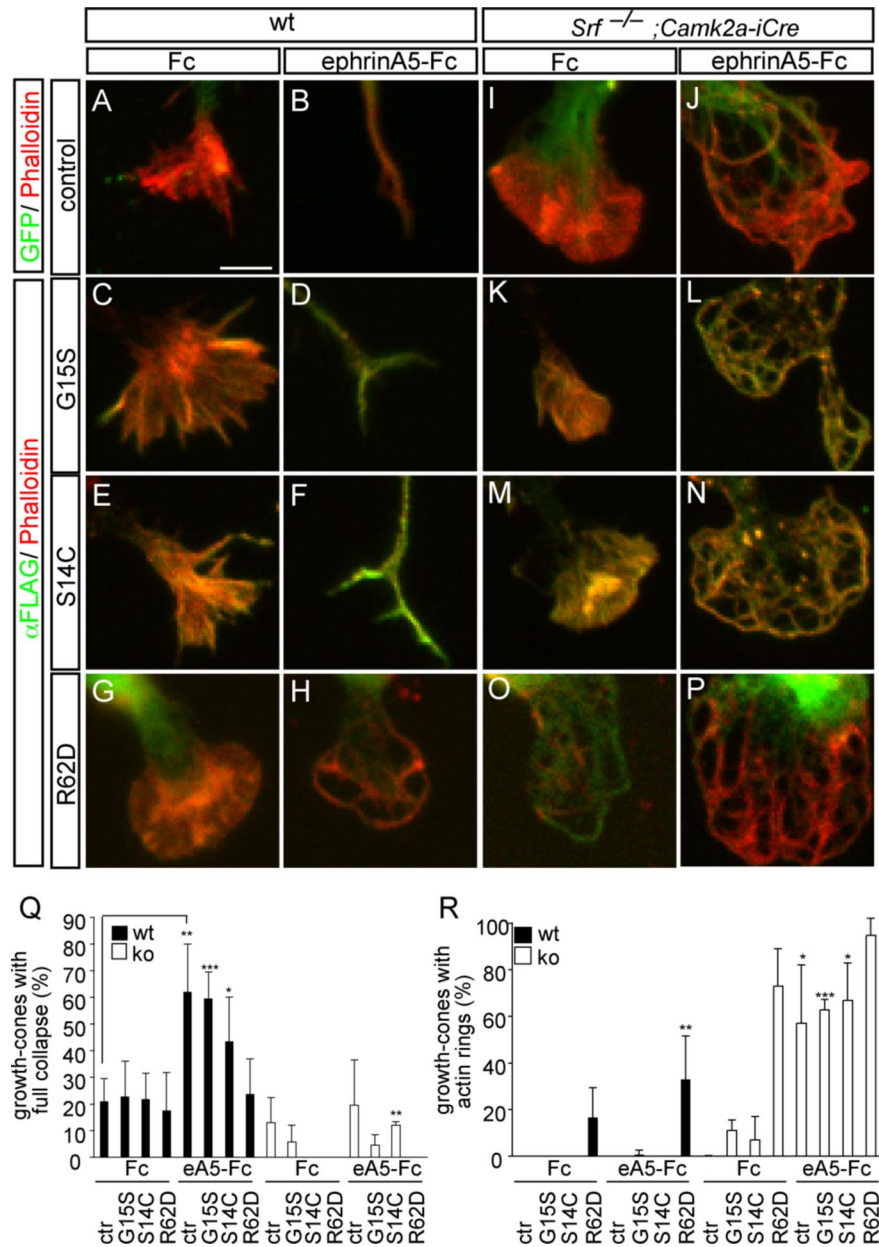


Figure 3. R62D actin phenocopies *Srf* mutant growth cones. Wild-type (*A–H*) and SRF-deficient growth cones (*I–P*) were stimulated with Fc (control) or ephrin-A5-Fc. *A–H*, Neurons incubated with Fc (*A*) elaborated growth cones with individual filopodia, as do neurons expressing G15S (*C*) and S14C (*E*). Both G15S (*D*) and S14C (*F*) allowed for full growth-cone collapse upon ephrin-A5 treatment as in control (*B*). Contrastingly, R62D (*G*) induced aberrant growth-cone structures lacking filopodia. After ephrin-A5 addition, R62D growth cones did not collapse yet retain actin rings (*H*) very reminiscent of *Srf*-mutant growth cones after ephrin incubation (*J*, *L*, *N*, *P*). *I–P*, *Srf*-mutant growth cones typically did not contain filopodia (*I*) and retained F-actin rings upon ephrin-A treatment (*J*). Expression of G15S (*K*, *L*) or S14C (*M*, *N*) was not sufficient to rescue SRF ablation. Contrastingly, R62D induced, in absence of ephrin-A5, already F-actin rings (*O*), which cannot be further augmented by ephrin-A addition (*P*). *Q*, Quantification of the percentage of growth cones being fully collapsed as depicted in *B*, *D*, and *F*. *R*, The percentage of growth cones with F-actin rings as shown in *O*, *J*, *L*, *N*, and *P* is depicted. In *Q* and *R*, statistical significance is given by comparing corresponding Fc with eA5-Fc samples. Scale bar: (in *A*) *A–P*, 2 μ m.

First, actin signaling requires SRF, as modulation of neuronal morphology by all actin mutants failed in *Srf* mutants. Second, R62D expression mimicked *Srf*^{-/-} phenotypes, indicating genetic interaction in an actin–SRF signaling pathway. These phenotypes included reduced neurite length, broadened neurite shaft, lack of growth-cone filopodia, impaired ephrin-A stimulated growth-cone collapse. R62D induced these phenotypes in part by blocking SRF gene activity, as coexpression of SRF-VP16

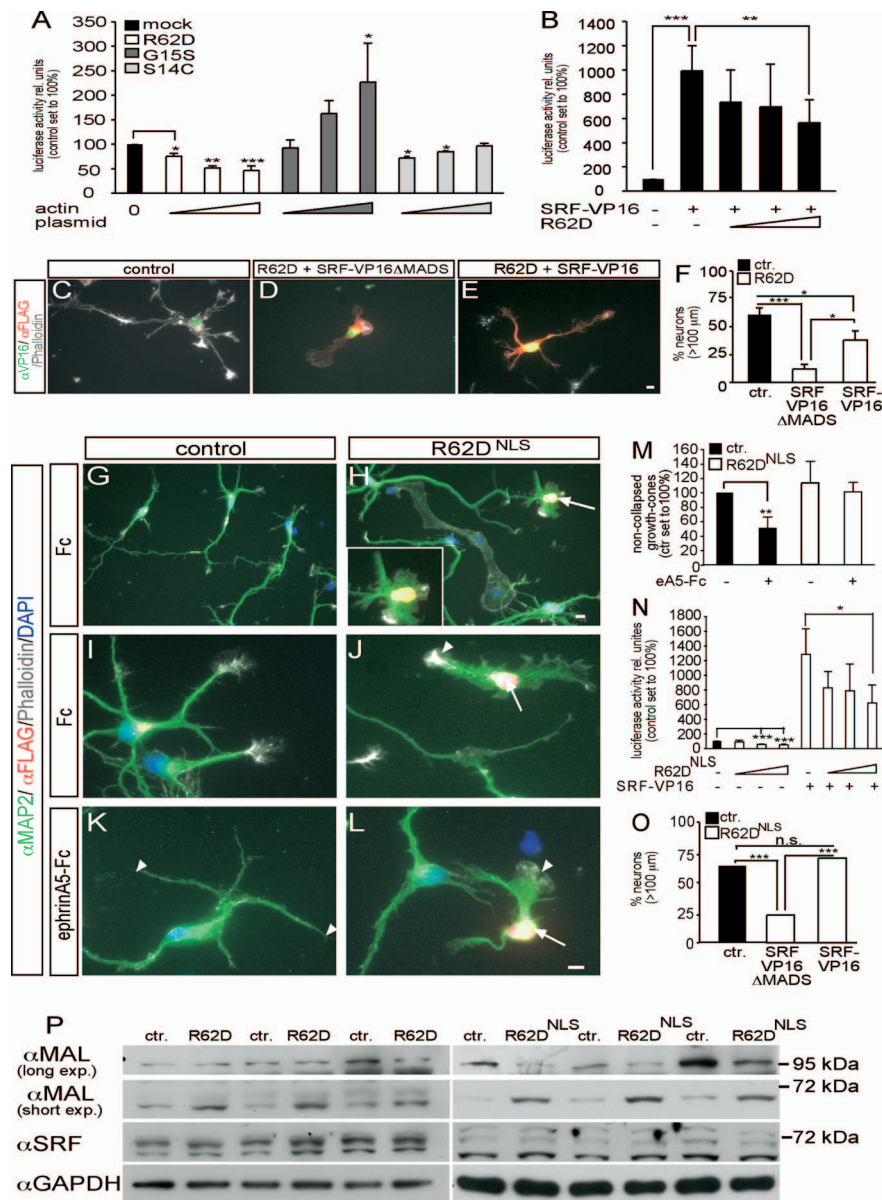


Figure 4. Actin signaling modulates neuronal gene expression. **A**, R62D decreased, G15S increased, and S14C did not influence SRF luciferase activity in neurons. **B**, R62D antagonized constitutively active SRF (SRF-VP16)-induced luciferase activity. **C–F**, SRF-VP16 (**E**) partially rescued R62D-decreased neurite length in contrast to SRF-VP16 Δ MADS (**D**) used as control (quantified in **F**). **G–M**, R62D expression, confined to the nucleus (R62D^{NLS}), was recognized by its FLAG tag. R62D^{NLS}-positive neurons (**H, J, L**, arrows) showed severe structural abnormalities including decreased neurite length and lack of growth-cone filopodia. In control neurons (**K**), growth cones were collapsed by ephrin-A5 (**K**, arrowheads). Contrastingly, ephrin-A5 failed to collapse a growth cone (**L**, arrowhead) of an R62D^{NLS}-expressing neuron (**L**, arrow; quantified in **M**). **N**, R62D^{NLS} decreased SRF luciferase activity and counteracted SRF-VP16 enhanced gene activity (see **B**). **O**, SRF-VP16 fully rescued R62D^{NLS}-decreased neurite length. **P**, Cytoplasmic R62D and R62D^{NLS} modulated expression of MAL, but not SRF. R62D^{NLS} decreased expression of a 100 kDa MAL protein, but upregulated a MAL variant of ~70 kDa. Cytoplasmic R62D increased abundance of the 70 kDa MAL protein, but not of 100 kDa MAL. Triplicate culture of three different mice for R62D and R62D^{NLS} are shown. Scale bars (**C–E, G–L**), 5 μ m.

alleviated severity of R62D phenotypes (Fig. 4C–F). As SRF-VP16 rescued cytoplasmic R62D-decreased neurite length to a considerable, yet not complete extent, this suggests that cytoplasmic R62D does impinge on neuronal motility also by its “non-nuclear” function, i.e., modulating cytoplasmic actin dynamics. Third, we used a nuclear-resident actin mutant (R62D^{NLS}) without any cytoplasmic access to demonstrate modulation of neuron motility by nuclear actin. Similar to cytoplasmic R62D (Fig. 2), R62D^{NLS} decreased neurite outgrowth (Fig. 4). In contrast to the cytoplasmic R62D mutant (see above), SRF-VP16 could

rescue R62D^{NLS}-decreased neurite length entirely. In sum, these data show that R62D actin inhibits neuronal motility by both, impinging on coordinated cytoplasmic actin treadmilling and also by inhibiting nuclear SRF gene transcription.

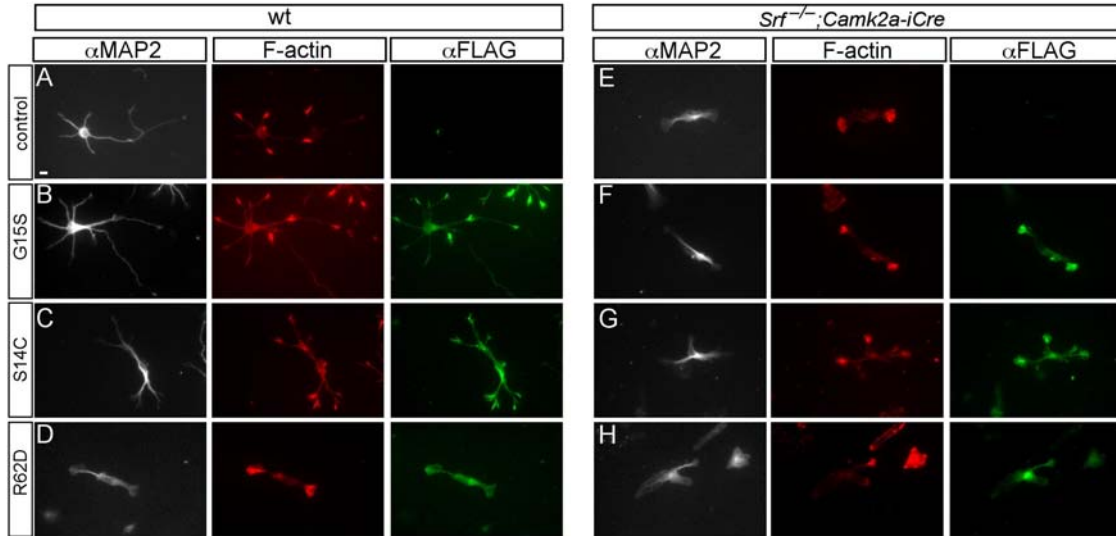
How would actin influence gene expression? Nuclear actin directly influences the core transcription machinery (Grummt, 2006). Additionally, actin dynamics regulate MAL nuclear translocation (Posern and Treisman, 2006). However in neurons, MAL appears constitutively nuclear (Kalita et al., 2006) (supplemental Fig. 3, available at www.jneurosci.org as supplemental material), arguing for a different mechanism. Our data show that actin adjusts MAL expression rather than localization (Fig. 4P) and this might impinge on SRF activity.

How is SRF ensuring dynamic regulation of the neuronal cytoskeleton? Activity of the actin-severing proteins gelsolin and cofilin is reduced in *Srf* mutants and might thereby disable actin filament turn-over (Alberti et al., 2005). Triple Mena/Vasp/Evl mutant neurons (Kwiatkowski et al., 2007), key molecules of filopodia formation (Drees and Gertler, 2008), resemble *Srf*^{-/-} neurons suggesting that *Ena/Vasp* genes might be potential SRF target genes or upstream regulators.

References

- Alberti S, Krause SM, Kretz O, Philipp U, Lemberger T, Casanova E, Wiebel FF, Schwarz H, Frotscher M, Schütz G, Nordheim A (2005) Neuronal migration in the murine rostral migratory stream requires serum response factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:6148–6153.
- Dent EW, Gertler FB (2003) Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* 40:209–227.
- Drees F, Gertler FB (2008) Ena/VASP: proteins at the tip of the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 18:53–59.
- Etkin A, Alarcón JM, Weisberg SP, Touzani K, Huang YY, Nordheim A, Kandel ER (2006) A role in learning for SRF: deletion in the adult forebrain disrupts LTD and the formation of an immediate memory of a novel context. *Neuron* 50:127–143.
- Gallo G, Letourneau PC (2004) Regulation of growth cone actin filaments by guidance cues. *J Neurobiol* 58:92–102.
- Gallo G, Yee HF Jr, Letourneau PC (2002) Actin turnover is required to prevent axon retraction driven by endogenous actomyosin contractility. *J Cell Biol* 158:1219–1228.
- Grummt I (2006) Actin and myosin as transcription factors. *Curr Opin Genet Dev* 16:191–196.
- Kalil K, Dent EW (2005) Touch and go: guidance cues signal to the growth cone cytoskeleton. *Curr Opin Neurobiol* 15:521–526.
- Kalita K, Kharebava G, Zheng JJ, Hetman M (2006) Role of megakaryoblastic acute leukemia-1 in ERK1/2-dependent stimulation of serum response factor-driven transcription by BDNF or increased synaptic activity. *J Neurosci* 26:10020–10032.

- Knöll B, Drescher U (2002) Ephrin-As as receptors in topographic projections. *Trends Neurosci* 25:145–149.
- Knöll B, Kretz O, Fiedler C, Alberti S, Schütz G, Frotscher M, Nordheim A (2006) Serum response factor controls neuronal circuit assembly in the hippocampus. *Nat Neurosci* 9:195–204.
- Kuwahara K, Barrientos T, Pipes GC, Li S, Olson EN (2005) Muscle-specific signaling mechanism that links actin dynamics to serum response factor. *Mol Cell Biol* 25:3173–3181.
- Kwiatkowski AV, Rubinson DA, Dent EW, Edward van Veen J, Leslie JD, Zhang J, Mebane LM, Philippar U, Pinheiro EM, Burds AA, Bronson RT, Mori S, Fässler R, Gertler FB (2007) Ena/VASP is required for neurogenesis in the developing cortex. *Neuron* 56:441–455.
- Miano JM, Long X, Fujiwara K (2007) Serum response factor: master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:C70–C81.
- Miralles F, Posern G, Zaromytidou AI, Treisman R (2003) Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* 113:329–342.
- Pak CW, Flynn KC, Bamberg JR (2008) Actin-binding proteins take the reins in growth cones. *Nat Rev Neurosci* 9:136–147.
- Pandithage R, Lilischkis R, Harting K, Wolf A, Jedamzik B, Lüscher-Firzlaff J, Vervoorts J, Lasonder E, Kremmer E, Knöll B, Lüscher B (2008) The regulation of SIRT2 function by cyclin-dependent kinases affects cell motility. *J Cell Biol* 180:915–929.
- Pasquale EB (2005) Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:462–475.
- Pipes GC, Creemers EE, Olson EN (2006) The myocardin family of transcriptional coactivators: versatile regulators of cell growth, migration, and myogenesis. *Genes Dev* 20:1545–1556.
- Posern G, Treisman R (2006) Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction. *Trends Cell Biol* 16:588–596.
- Posern G, Sotiropoulos A, Treisman R (2002) Mutant actins demonstrate a role for unpolymerized actin in control of transcription by serum response factor. *Mol Biol Cell* 13:4167–4178.
- Posern G, Miralles F, Guettler S, Treisman R (2004) Mutant actins that stabilise F-actin use distinct mechanisms to activate the SRF coactivator MAL. *EMBO J* 23:3973–3983.
- Ramanan N, Shen Y, Sarsfield S, Lemberger T, Schütz G, Linden DJ, Ginty DD (2005) SRF mediates activity-induced gene expression and synaptic plasticity but not neuronal viability. *Nat Neurosci* 8:759–767.
- Reid T, Furuyashiki T, Ishizaki T, Watanabe G, Watanabe N, Fujisawa K, Morii N, Madaule P, Narumiya S (1996) Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and rhophilin in the rho-binding domain. *J Biol Chem* 271:13556–13560.
- Sarmiere PD, Bamberg JR (2004) Regulation of the neuronal actin cytoskeleton by ADF/cofilin. *J Neurobiol* 58:103–117.
- Schratt G, Philippar U, Berger J, Schwarz H, Heidenreich O, Nordheim A (2002) Serum response factor is crucial for actin cytoskeletal organization and focal adhesion assembly in embryonic stem cells. *J Cell Biol* 156:737–750.
- Sun Q, Chen G, Streb JW, Long X, Yang Y, Stoeckert CJ Jr, Miano JM (2006) Defining the mammalian CArGome. *Genome Res* 16:197–207.
- Svitkina TM, Borisy GG (1998) Correlative light and electron microscopy of the cytoskeleton of cultured cells. *Methods Enzymol* 298:570–592.
- Vartiainen MK, Guettler S, Larjani B, Treisman R (2007) Nuclear actin regulates dynamic subcellular localization and activity of the SRF cofactor MAL. *Science* 316:1749–1752.
- Wickramasinghe SR, Alvania RS, Ramanan N, Wood JN, Mandai K, Ginty DD (2008) Serum response factor mediates NGF-dependent target innervation by embryonic DRG sensory neurons. *Neuron* 58:532–545.

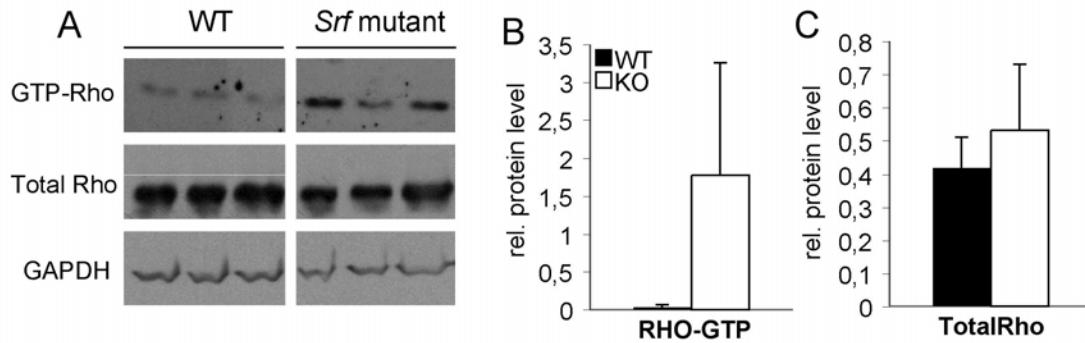
SUPPLEMENTARY FIGURES**Supp. Fig. 1****Actin signaling affects neurite outgrowth**

Wild-type (A-D) or SRF-deficient (E-H) hippocampal neurons were stained with Phalloidin to label F-actin (red), anti-FLAG to visualize actin mutants (green) and anti-MAP2 antibodies (white).

(A-D) Compared to mock-electroporated (A), G15S actin (B) increased, S14C (C) slightly and R62D (D) strongly decreased neurite-length. In F-actin stabilizing mutants G15S and S14C (B, C), FLAG and Phalloidin staining merged (see also Fig. 2). In contrast, R62D actin was mostly excluded from the F-actin rich growth-cone (D). Notably, R62D expressing neurons (D) resembled SRF-deficient neurons (see E-H).

(E-H) SRF-deficient neurons (E) were shorter than wild-type neurons (see A)). Actin signaling by G15S (F), S14C (G) or R62D (H) failed to rescue neurite-length.

Scale-bar (A-H) = 10 μ m

Supp. Fig. 2**Rho-GTPases are more active in *Srf* mutant cortex**

Rho-GTPase activity was measured by pulling-down active Rho (GTP-Rho) via Rhotekin-GST from P14 cortical wt or *Srf* mutant brain tissue. Protein samples were resolved by SDS-PAGE followed by blotting with an antibody recognizing RhoA, B and C (Upstate) in the pull-down (Rho-GTP) or in the input.

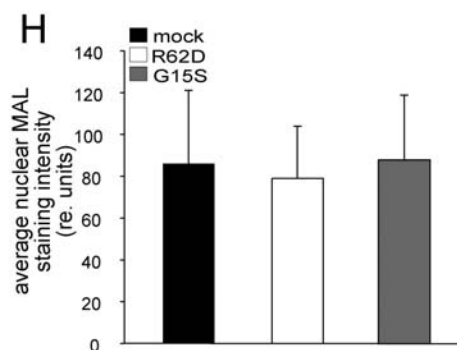
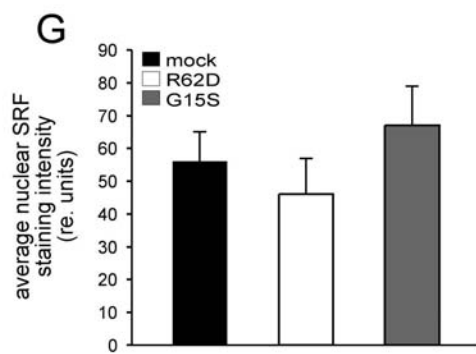
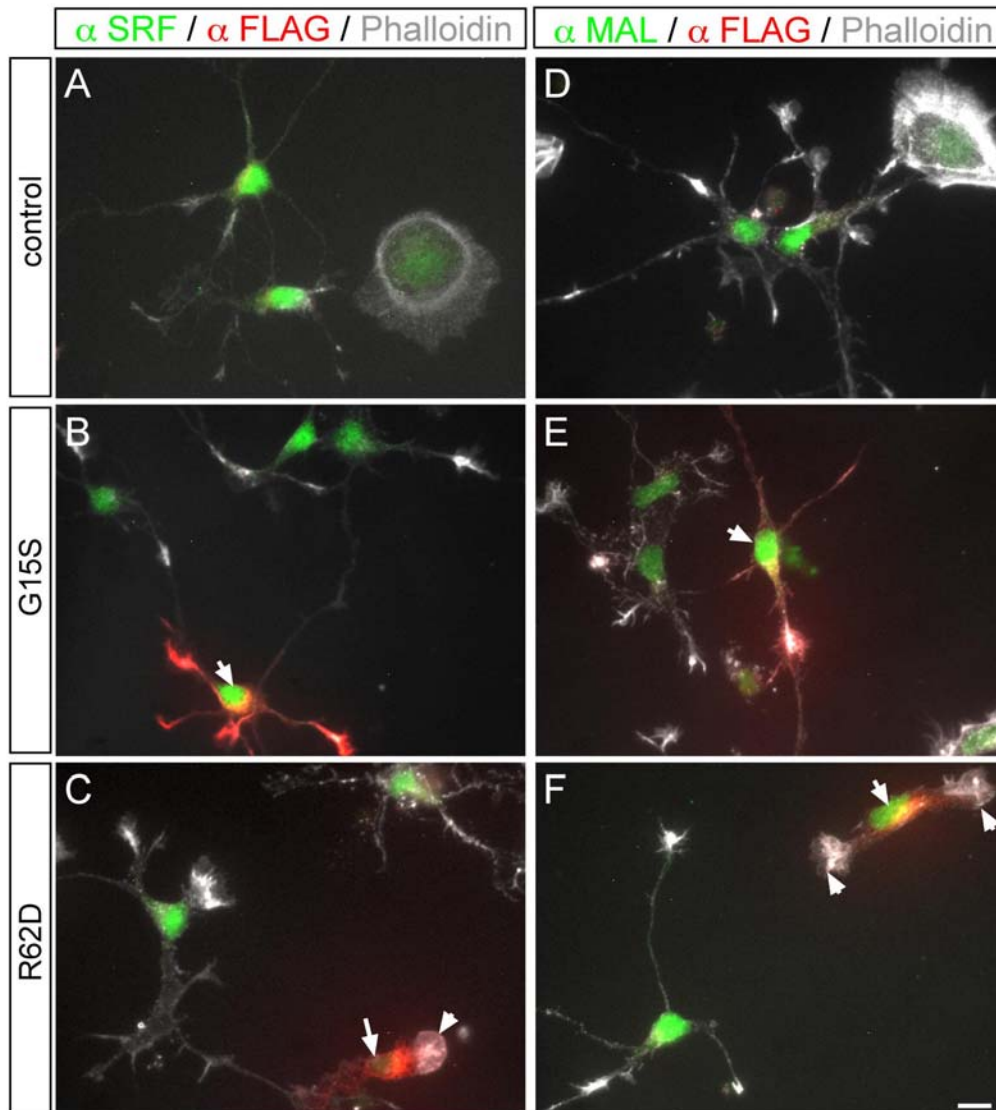
(A) Active Rho (Rho-GTP) is elevated in *Srf* mutants compared to wildtype. Three different mice are depicted. Total Rho levels in the input are not altered. GAPDH reveals equal loading of protein gel.

(B) Quantification of active Rho. Rho levels were normalized to the total Rho amount.

(C) Quantification of total Rho. Rho levels were normalized to GAPDH.

Supp. Fig. 3

SRF and MAL are constitutively nuclear localized in neurons and localization is not altered by actin mutants



Hippocampal neurons were stained for SRF (A-C) or MAL (D-F) along with anti-FLAG antibodies (red) and Phalloidin to label F-actin (white). Arrows indicate FLAG-positive neurons expressing the indicated actin mutant. Arrowheads point at individual growth-cones.

(A-C) Mock-electroporated neurons with nuclear SRF signal (A). In G15S (B) and R62D (C) expressing neurons, SRF still localizes to the nucleus and expression levels are not altered compared to control (A). Note the severe neuronal morphological changes including rounded-up growth-cone with no filopodia (arrowhead) and overall decreased neurite outgrowth induced by R62D (arrow in (C)). Also R62D G-actin is largely excluded from the F-actin enriched growth-cone (white signal).

(D-F) MAL is constitutively localized to the nucleus of hippocampal neurons in mock-electroporated (D), G15S (E) and R62D (F) expressing neurons. Note the R62D-induced neuronal phenotype (arrow in (F)) as described above (C).

(G) Quantification of the average nuclear SRF intensity using slidebook software (3i). No alterations in SRF intensity were discernable between mock, G15S and R62D.

(H) Quantification of the average nuclear MAL intensity. The overall MAL level is comparable in all conditions.

Scale-bar (A-F) = 10 μ m

Reelin signalling and SRF (Serum Response Factor) gene transcription synergise during hippocampal development

Christine Stritt and Bernd Knöll

Eberhard-Karls-University Tübingen
Interfaculty Institute for Cell Biology
Dep. Molecular Biology
Neuronal Gene Expression Laboratory
Auf der Morgenstelle 15
72076 Tübingen
Germany

Corresponding author:

bernd.knoell@uni-tuebingen.de

phone: 0049-7071-29 78843

Short title: SRF in hippocampal lamination and branching

Key words: SRF, actin, cytoskeleton, cell motility, hippocampus, reelin, dendrite, branching

word count: 6208

SUMMARY

During brain development, neurones and their nerve fibres are often segregated in specific layers. The hippocampus is as a well-suited model system to study lamination in health and aberrant cell/fibre lamination associated with neurological disorders.

SRF (Serum Response Factor), a transcription factor, regulates synaptic activity-induced immediate early gene (IEG) induction and cytoskeleton-based neuronal motility. Using early postnatal conditional SRF ablation, we uncovered distorted hippocampal lamination including mal-positioning of granule cell neurones and disruption of layer-restricted termination of commissural-associational and mossy fibre axons. Besides axons, dendrite branching and spine morphogenesis in *Srf* mutants was impaired, offering a first morphological basis for SRF's reported role in learning and memory. *Srf* mutants resemble mice lacking components of the Reelin signalling cascade, a fundamental signalling entity in brain lamination. Our data indicate that Reelin signalling and SRF-mediated gene transcription might synergise: Reelin can induce IEG and cytoskeletal genes in an SRF-dependent manner. Further, Reelin-induced neurite motility is blocked in *Srf* mutants and constitutively-active SRF rescues impaired neurite extension in *reeler* mouse mutants.

In sum, data provided in this study show that SRF contributes to hippocampal layer and nerve fibre organisation and point at a link of SRF gene transcription and Reelin signalling.

INTRODUCTION

A recurrent scheme applicable to many tissues is organisation of cells into layers. An intriguing example of such cell lamination is the vertebrate brain. During brain development, coordinated cell migration, nerve fibre outgrowth and guidance ensure layer formation. In the hippocampus, neuronal cell bodies are compacted in two layers, the dentate gyrus (DG) granule cell layer (GCL) and the cornu ammonis (CA) pyramidal cell layer (PCL) (Forster et al., 2006b). Besides cell bodies, nerve fibres are also bundled in distinct layers including the mossy fibre axons connecting the GCL with the PCL (see Fig. 1A). Additionally, both hippocampi are connected with each other via commissural/associational (C/A) axons.

In this study, we investigate whether gene expression programs governed by SRF (Serum Response Factor) contribute to lamination in the mouse brain. SRF recognises the Serum Response Element (SRE) including the CArG box(es) [CC (AT)₆ GG] in target gene promoters (Posern and Treisman, 2006). In neurones, SRF emerged as a paradigmatic transcriptional regulator conveying the immediate early gene (IEG) response – a hallmark of neuronal activation – providing rapid but transient induction of e.g. *Egr1*, *Egr2*, *Srf*, *Bdnf* and *c-fos* mRNA via e.g. MAP kinase signalling (Etkin et al., 2006; Knoll and Nordheim, 2009; Ramanan et al., 2005). In addition, SRF modulates cytoskeletal dynamics by regulating actin gene transcription (e.g. *Actb*, *Actg*, *Gsn*, *Vcl*) (Miano et al., 2007; Posern and Treisman, 2006) and adjusting Cofilin activity (Alberti et al., 2005). In neurones (Stern et al., 2009) and non-neuronal cells (Sotiropoulos et al., 1999), actin treadmilling and SRF gene activity represent an intimate signalling entity with actin signalling also adjusting SRF activity (Knoll and Nordheim, 2009). In *Srf* mutants, many processes relying on propagation of neuronal activity via IEGs and motility are distorted: conditional *Srf* mouse mutagenesis revealed essential SRF functions in tangential neuronal migration along the rostral migratory stream (Alberti et al., 2005), in neurite outgrowth, growth cone motility and axon guidance of hippocampal mossy fibres (Knoll et al., 2006; Stern et al., 2009) and peripheral axons (Wickramasinghe et al.,

2008). These deficits in initial brain wiring are associated with impaired learning and memory in the adult (Etkin et al., 2006; Ramanan et al., 2005). Also, axonal insulation by the myelin sheath is governed by SRF gene transcription (Stritt et al., 2009). Herein, we demonstrate hippocampal lamination defects including GCL dispersion, C/A misrouting, aberrant dendritic branching and reduced dendritic spine number in the PCL of *Srf* mutants.

Phenotypes associated with SRF-deficiency resemble those described in mouse mutants of the Reelin signalling pathway, an important signalling complex in brain lamination (D'Arcangelo, 2006; Forster et al., 2006a; Herz and Chen, 2006; Rice and Curran, 2001; Tissir and Goffinet, 2003). Reelin is a large secreted extracellular matrix protein (D'Arcangelo et al., 1995; Miao et al., 1994) engaging VLDLR (Very Low Density Lipoprotein Receptor) and ApoER2 (Apolipoprotein E Receptor 2) as receptors (D'Arcangelo et al., 1999; Herz and Chen, 2006; Hiesberger et al., 1999; Trommsdorff et al., 1999). In the hippocampus of *Reelin*, *Vldlr* and *Apoer2* mutant mice, GCL dispersion and C/A fibre misrouting was reported (Borrell et al., 1999a; Borrell et al., 1999b; Del Rio et al., 1997; Deller et al., 1999; Drakew et al., 2002; Frotscher et al., 2003; Zhao et al., 2004). Reelin provides positional information to migrating cells in two ways, i.e. acting as a (gradedly distributed) stop signal secreted by e.g. Cajal-Retzius (CR) cells (Dulabon et al., 2000; Rice and Curran, 2001; Soriano and Del Rio, 2005) or facilitating detachment from the glial track (Hack et al., 2002; Sanada et al., 2004; Simo et al., 2007). Organisation of the radial glia track is also promoted by Reelin (Forster et al., 2002; Hartfuss et al., 2003; Weiss et al., 2003; Zhao et al., 2004). In addition to distorted cell migration, reeler mice display severe axonal and dendritic malformations including reduced branching and overall neurite length (Borrell et al., 1999a; Borrell et al., 2007; Niu et al., 2004; Niu et al., 2008). In vitro, Reelin enhances neurite length and branch formation (Jossin and Goffinet, 2007; Matsuki et al., 2008; Niu et al., 2004). Until now, Reelin signalling has not been implicated in altering gene expression except for Reelin activating *Egr1* (Simo et al., 2007), an SRF target gene.

In this study, we provide a broader scope on Reelin's potential to modulate gene transcription. Reelin up-regulates IEGs and activates cytoskeletal genes in an SRF-dependent manner. We further demonstrate a potential functional interdependence of Reelin and SRF signalling. In *Srf* mutant neurones, Reelin-induced neurite branching is blocked. Complementarily, constitutively-active SRF can rescue impaired neurite outgrowth in reeler mice.

In sum, our data identify SRF as a regulator of hippocampal lamination and indicate that SRF may operate as a downstream transcriptional target of the Reelin signalling cascade.

RESULTS

SRF regulates lamination of dentate gyrus GCL neurones and C/A fibre segregation

To address a role for SRF in hippocampal layering, we analysed conditional *Srf* mutants (*Srf*^{-/-}; *Camk2a-iCre*) allowing for early postnatal SRF ablation in forebrain regions such as the hippocampus and cortex (Alberti et al., 2005; Knoll et al., 2006). We interbred *Srf* mutants with the *thy1-GFP* mouse line allowing for visualisation of individual neurone morphology via GFP distribution (Feng et al., 2000).

In mice carrying either one or two *Srf* wild-type alleles (thereafter referred to as “control”), mossy fibre axons emanating the GCL segregated in the supra- and infrapyramidal branch navigating outside CA3 stratum pyramidale (arrows and arrowhead in Fig. 1A, respectively). Contrastingly, and in line with our previous findings (Knoll et al., 2006), in *Srf* mutants, mossy fibre axons entered CA3 stratum pyramidale and did not bifurcate (arrows, Fig. 1B). In addition to mossy fibres (Fig. 1A, B), targeting of C/A axons to GCL neurone dendrites was disturbed in *Srf* mutants (Fig. 1C-L). In control mice at P14 (Fig. 1C, E), C/A fibres labelled with Calretinin formed a distinct axon bundle terminating at proximal parts of GCL dendrites (arrows Fig. 1E). Contrastingly, in *Srf* mutants (Fig. 1D, F), C/A fibres failed to fasciculate and now spread throughout the GCL layer (arrows Fig. 1F). We also noted dispersion of GCL neurones in *Srf* mutants (Fig. 1D, F). In control mice (Fig. 1C, E), the majority of GFP-positive GCL neurones were situated underneath the Calretinin-labelled C/A fibres, whereas in *Srf* mutants (Fig. 1D, F) many GFP-positive neurones localised ectopically (arrowhead in Fig. 1F) above the DAPI-positive GCL layer (wt: $10 \pm 6\%$ mis-localised neurones; ko: $42 \pm 12\%$; n = 6 mice each genotype; $P \leq 0.001$). In a different experimental set (Fig. 1G-L), we co-localised Calretinin-positive C/A fibres with all Calbindin-expressing GCL neurones. As before (Fig. 1C-F), Calretinin-positive C/A fibres were misrouted and Calbindin-positive GCL neurones were intermingled with C/A fibres in *Srf* mutants (Fig. 1H, J, L), but not in

control (Fig. 1G, I, K; wt: 8.6 ± 4 mis-localised neurones/mm DG; ko: 67 ± 4 ; n = 3 mice each genotype; $P \leq 0.001$).

In sum, these data reveal a role for SRF in hippocampal (Fig. 1) and cortical (Fig. S1) layering, suggesting that SRF contributes to lamination processes in both brain areas.

Ectopic dendritic branching and reduced dendritic arbor complexity in *Srf* mutants

In addition to the DG, SRF is also deleted in the CA1 stratum pyramidale of *Srf* mutants (Fig. 2A, B and data not shown). Besides a lamination defect in the DG (Fig. 1), we observed reduced compaction of CA1 pyramidal neurones of *Srf* mutants (Fig. 2D) compared to control (Fig. 2C). Using *Thy1*-GFP mice as reporter for individual neurone morphology, we observed that control CA1 pyramidal neurones protruded expectedly two dendritic tufts: a basal tuft localised above and an apical tuft situated underneath the CA1 cell body layer (Fig. 2C, E, G). Within the DAPI-positive CA1 stratum pyramidale of wild-type mice, dendritic branching is absent (see arrows Fig. 2E, G). Contrastingly, in *Srf* mutants we noted exuberant dendritic branches within stratum pyramidale (arrows Fig. 2F, H; wt: $11.7 \pm 10\%$ neurones with ectopic branching; ko: $74 \pm 7.6\%$; n = 8 mice each genotype; $P \leq 0.001$). This ectopic dendritic branching within CA1 (Fig. 2 F, H) is accompanied by an overall reduction of the apical dendritic arborisation outside stratum pyramidale in *Srf* mutants (Fig. 2J). This was revealed when assessing the entire dendritic tree of all neurones using the dendrite marker MAP2 (Fig. 2I, J). We observed a strong reduction in CA1 apical dendrite number in *Srf* mutants (Fig. 2J), compared to control (Fig. 2I; wt: 75.3 ± 11 dendrites/area; ko: $20 \pm 7.5\%$; n = 3 mice each genotype; $P \leq 0.01$). This reduction is CA1 specific, as in the entire hippocampus dendrite arborisation is only slightly reduced in *Srf* mutants (Fig. 1A, B; Fig. S2). Complementary to this SRF loss-of-function data, demonstrating reduced dendritic branching (Fig. 2), constitutively-active SRF-VP16 (Schratt et al., 2002) elevates branch formation (Fig. S3).

As SRF-deficiency impaired neuronal activity-envoked IEG induction (Ramanan et al., 2005) and learning and memory (Etkin et al., 2006), we inspected dendritic spine formation (Fig. 2K, L). Indeed, numbers of mushroom-shaped spines of apical and basal dendrites were reduced in *Srf* mutants (Fig. 2L), compared to control (Fig. 2K; basal dendrites: wt: 5.3 ± 1.2 spines/10 μ m; ko: 3.5 ± 0.9 ; $P \leq 0.01$; apical dendrites: wt: 5.7 ± 1.3 spines/10 μ m; ko: 3.7 ± 0.4 ; $n \geq 6$ mice each genotype; $P \leq 0.01$).

Reelin-expressing cells are displaced in the *Srf* mutant hippocampus

Phenotypes observed in *Srf* mutants, including dispersed GCL lamination (Fig. 1), C/A misrouting (Fig. 1) and impaired dendritic arbor formation (Fig. 2) are reminiscent of mouse mutants of the Reelin signalling pathway (Drakew et al., 2002; Niu et al., 2004; Niu et al., 2008; Rice and Curran, 2001; Tissir and Goffinet, 2003). This encouraged us to address whether SRF is linked to Reelin signalling.

We first analysed whether positioning of Reelin-positive cells is affected in the SRF-deficient hippocampus (Fig. 3; $n \geq 3$ mice each genotype). In wild-type, Reelin is predominantly found in CR cells of the DG molecular layer (arrowheads, Fig. 3A), an expression not obviously altered by SRF-deficiency (arrowheads, Fig. 3B). In addition, in control mice, Reelin is localised in the stratum oriens, a layer localised in close vicinity to the CA1 pyramidal neurones (arrows in Fig. 3A and C). Unlike in controls (Fig. 3A, C, E, G), where Reelin surrounded the basal dendritic tuft of CA1 pyramidal neurones (arrows in Fig. 3A, C), in *Srf* mutants Reelin-positive cells additionally entered the CA1 cell body layer (arrows in Fig. 3B, D, H; for quantification see Fig. 3K, L). These ectopic Reelin-positive cells frequently adopted an orientation perpendicular to those found in wild-type CA1 (compare Fig. 3H with G). Reelin stimulates dendrite formation (Deller et al., 1999; Jossin and Goffinet, 2007; Matsuki et al., 2008; Niu et al., 2004; Niu et al., 2008). Notably in *Srf* mutants, ectopic Reelin

localisation coincides with exuberant dendritic branching of CA1 pyramidal neurones (see *Thy1*-GFP neurones in Fig. 3C-F).

SRF is not a major transcriptional regulator of genes encoding Reelin signalling components

Next, we assessed whether SRF operates as a transcriptional regulator of components of the Reelin signalling cascade (Fig. 4). Using quantitative real-time PCR (qPCR), we found no mRNA alterations between control and *Srf* mutant in P6 and P14 hippocampi for *Reelin*, *ApoER2*, *Vldlr*, *Dab1* and other downstream signalling mediators implicated in the Reelin cascade, such as *Crk*, *Crk-l* and *Lis1* (Fig. 4; $n \geq 3$ mice each genotype). *Cdk5* and *p35* (Ayala et al., 2007; Rice and Curran, 2001) are reduced upon SRF ablation in the adult hippocampus (Etkin et al., 2006), yet not in early hippocampal development (Fig. 4). Doublecortin (*Dcx*), a microtubule-stabilising protein (Ayala et al., 2007) labelling newly generated neurones is decreased in *reeler* (Zhao et al., 2007) and in *Srf* mutant mice (Fig. 4). *Filamin A* (*Flna*), a gene whose mutation similarly to Reelin mutation results in human congenital disorder due to impaired cell migration (Ayala et al., 2007), was reduced on RNA level in *Srf* mutants (Fig. 4).

In sum, our data suggest that SRF is not a major transcriptional regulator of “canonical” Reelin signalling components. Yet, cytoskeletal genes (*Flna*, *Dcx*) whose mutation results in “reeler-like” phenotypes were affected by SRF-deficiency.

Reelin modulates SRF-mediated gene transcription

To analyse a potential functional interdependence of Reelin and SRF-mediated gene expression, we tested whether Reelin might trigger a signalling cascade ultimately resulting in SRF-mediated gene activity. For this, primary neurones were stimulated in a time course (30 mins - 4h) with recombinant Reelin or the neurotrophin BDNF (brain derived neurotrophic

factor), a known SRF activating stimulus (Kalita et al., 2006; Wickramasinghe et al., 2008; Fig. 5 and Fig. S4; n numbers reflecting numbers of mice analysed are indicated in Fig. 5). Subsequently, RNA was isolated and cDNA was subjected to quantitative real-time PCR (qPCR). As control, we used for every single time-point supernatants of a GFP-expressing HEK293 cell line. Inclusion of this control was important, as IEG (but not cytoskeletal gene) induction occurred already by application of this control medium. Importantly, Reelin containing medium further enhanced IEG levels obtained by application of control medium (see below).

In agreement with previous results (Simo et al., 2007), Reelin elevated mRNA levels of the well-known SRF target gene *Egr1* (Fig. 5D and Fig. S4). We extended this study by demonstrating that Reelin at individual time-points of stimulation up-regulates various IEG mRNAs: in addition to *Egr1*, the IEGs *Srf* (Fig. 5A), *Arc* (Fig. 5B), *c-fos* (Fig. 5C), *Egr2* (Fig. 5E) and *Egr3* (Fig. 5F) were also to a various extent transiently up-regulated by Reelin (see also Fig. S4). Reelin not only elevates IEG, but also increases mRNA levels of cytoskeletal genes encoding for actin isoforms (*Acta2*; Fig. 5G), Tropomyosin2b (*Tpm2b*; Fig. 5H), FilaminA (*Flna*; Fig. 5I) and *Arc* (Fig. 5B; the latter is both an IEG and cytoskeletal modulator; see also Fig. S4). Further support for Reelin inducing gene expression is provided in an independent series of experiments using Reelin derived from ten-fold concentrated tissue culture supernatants (Fig. S5). Additionally, Reelin augments SRF-dependent reporter gene activity (Fig. S6). Of note, compared to mRNA levels induced by BDNF, Reelin responses were, particularly for IEGs, less pronounced (see Fig. S4). However, it should be kept in mind that BDNF is commercially available, highly purified and added in high concentrations, compared to Reelin which was applied as tissue culture supernatant.

Furthermore, we provide data that Reelin-mediated induction of gene transcription relies on SRF activity, as in *Srf* mutant cultures, Reelin induces mRNA levels of the aforementioned genes less efficiently (Fig. 5 and Fig. S4).

In addition to IEGs and cytoskeletal genes, we also analyzed the Egr1 target gene *p53* (Nair et al., 1997), whose homolog *p73* is co-expressed with Reelin in CR cells (Meyer et al., 2004). Interestingly, *p53* levels are down-regulated after 4h of Reelin stimulation, yet as revealed by *Srf* mutant cultures, independently of SRF (Fig. 5J and Fig. S4). Currently, the implication of this *p53* down-regulation by Reelin remains speculative, however *p53* emerges – besides its role in neuronal apoptosis - as a positive stimulator of neuronal motility (Tedeschi and Di Giovanni, 2009). Thus, Reelin-induced reduction of *p53* levels might influence e.g. cell migration.

In sum, we show that in neurones Reelin increases mRNA levels of IEGs and cytoskeletal genes in an SRF-dependent manner.

Reelin-stimulated neuritogenesis requires SRF

To further elucidate a possible downstream role of SRF in Reelin signalling, we asked whether Reelin-dependent neuronal motility requires SRF activity (Fig. 6).

Reelin enhances neurite length and branching in primary neuronal culture (Jossin and Goffinet, 2007; Matsuki et al., 2008; Niu et al., 2004). We stimulated hippocampal neurones by bath application of Reelin into the growth-medium. In wild-type culture, Reelin increased neurite length and branch number (Fig. 6A, C; n = 12 mice). Contrastingly, Reelin failed to increase neurite length and branch number in SRF-deficient cultures (Fig. 6B, D; see quantification Fig. 6E, F; n = 9 mice).

Although we cannot completely rule out that due to SRF's impact on cytoskeletal dynamics, *Srf* mutant neurones are intrinsically altered in such a way that they are less responsive to exogenously applied stimuli, this set of experiments suggests that Reelin-induced neuronal motility requires nuclear SRF activity.

SRF rescues reeler phenotypes in vitro

We next asked whether constitutively-active SRF could potentially rescue phenotypes evoked by Reelin-deficiency. To test this, we used Reelin-deficient hippocampal neurones in vitro (Fig. 7), which typically reveal reduced neurite length and number of branch points (Fig. 7C) (Niu et al., 2004) compared to wild type cultures (Fig. 7A; n = 3 mice). Overexpression of constitutively-active SRF-VP16 by adenoviral infection, significantly rescued impaired neurite outgrowth and branch formation evoked by Reelin-deficiency (Fig. 7D; n = 4 mice). Contrastingly, SRF-VP16 Δ MADS lacking SRF's DNA binding activity was unable to rescue reeler phenotypes in vitro (Fig. 7C). We also investigated heterozygous reeler mice (n = 3 mice), where SRF-VP16 expression likewise increased neurite outgrowth almost to wild-type levels (see quantification, Fig. 7E).

In sum, both loss- and gain-of-function experiments suggest that Reelin and SRF may operate in a shared signalling pathway.

DISCUSSION

SRF controls many aspects of hippocampal development

In this study we uncovered SRF as an important regulator of hippocampal development.

Firstly, SRF gene activity influences DG lamina formation and fibre segregation (Fig. 1). The DG is formed by two waves encompassing initial DG population by neurones migrating from the ventricular zone (Frotscher et al., 2007; Li and Pleasure, 2005). As in *Srf* mutants, the DG area is populated similarly to wild-type (Fig. 1), primary DG formation occurs SRF-independently. A secondary postnatal proliferation zone is localised to the hilus, from where granule cells invade the DG. In *Srf* mutants, many GCL neurones are dispersed (Fig. 1; (Alberti et al., 2005)), suggesting that SRF contributes to granule cell radial migration from the hilus to the DG. This data, together with impaired cell layering in the *Srf* mutant cortex (Fig. S1), suggests that SRF directs radial cell migration and, as shown before, also tangential migration (Alberti et al., 2005). On this note, localisation of tangentially migrating CR cells was also altered in *Srf* mutant hippocampi (Fig. 3). Besides GCL dispersion, C/A fibres in the DG are displaced in *Srf* mutants (Fig. 1). The extent of the hippocampal commissure appears normal in *Srf* mutants (Stritt et al., 2009), arguing against extensive fibre loss as major cause. Instead, our data favour a model where – similar to reeler mice (see below) – C/A fibres are misrouted as a secondary effect to an initial GCL dispersion. In reeler mutants, impaired signalling by guidance cues presented on GCL dendrites, but not on C/A fibres, appears critical for proper C/A fibre targeting (Forster et al., 2006b; Frotscher et al., 2007).

Secondly, besides axon pathfinding (Fig. 1 and (Knoll et al., 2006)), SRF stimulates dendritic branching and spine number (Fig. 2, Fig. S3). SRF elicits LTP (Ramanan et al., 2005) and LTD responses (Etkin et al., 2006) and memory formation while encountering a novel environment (Etkin et al., 2006). Thus, reduced dendrite complexity and spine number in *Srf* mutants (Fig. 2) might represent a first morphological counterpart underlying these neuronal transmission and behavioural impairments.

Reelin and SRF can operate in a shared signalling pathway

In this study we provide data arguing that Reelin and SRF may operate in a shared signalling pathway.

Firstly, *Srf* mutant phenotypes are similar to mouse mutants of the Reelin cascade. Phenotypes shared include aberrant DG lamination, C/A fibre mis-routing, reduced dendrite and spine number (Frotscher et al., 2007; Niu et al., 2008; Rice and Curran, 2001; Tissir and Goffinet, 2003). This suggests that Reelin and SRF might synergise in the same signalling pathway. Consequently, loss of SRF function prevents coordinate propagation of Reelin signalling and thereby results in “reeler-like” phenotypes. *Srf* mutant phenotypes are not as severe as in reeler mice arguing that SRF is not the only Reelin target and Reelin is likely diverging signalling to multiple downstream targets.

Secondly, SRF-deficiency affects positioning and perhaps thereby signalling of Reelin-expressing cells in the hippocampal CA1 area (Fig. 3). In *Srf* mutants, ectopic Reelin expressing cells enter CA1 stratum pyramidale, coinciding with ectopic dendritic branching in this area. Reelin stimulates neurite branching (Jossin and Goffinet, 2007; Matsuki et al., 2008; Niu et al., 2004; Niu et al., 2008), thus aberrant and elevated Reelin amounts in *Srf* mutants might cause unrestrained dendrite formation inside CA1 (although overall dendrite complexity of CA1 neurones is reduced). In agreement, our in vitro data suggest that there is some functional interdependence of Reelin and SRF in regulation of neurite outgrowth: in *Srf* mutants, Reelin fails to stimulate neuronal motility (Fig. 6) and, complementarily, SRF can partially rescue reeler phenotypes (Fig. 7).

A third mode of Reelin-SRF interaction might be activation of SRF-mediated gene expression upon Reelin stimulation. So far, Reelin has only been reported to up-regulate *Egr1*, yet the transcriptional regulator responsible was not elucidated in this study (Simo et al., 2007). We extended this study by showing that Reelin increases mRNA levels of various IEGs and

cytoskeletal genes (Fig. 5 and Fig. S4). Notably, we singled out SRF as an important transcription factor in conveying Reelin stimulation. Reelin stimulation rapidly, but transiently increased mRNAs of various IEGs (*Egr1*, *Egr2*, *Egr3*, *c-fos*, *Srf*, *Arc*). What might be the consequence of a Reelin-induced IEG response? IEG up-regulation marks neuronal activation upon various physiological and pathological stimuli and has also been associated with apoptosis during brain development (Chen et al., 1995; Miyashita et al., 2008). As Reelin-secreting CR cells are a transiently existing cell population, prone to elimination during hippocampal development (Soriano and Del Rio, 2005), an autocrine Reelin-induced IEG response might assist this elimination process. Reelin also up-regulated genes encoding actin isoforms (*Acta2*) or actin binding proteins (Filamin, Tropomyosin, *Arc*). Previously, Reelin was shown to inhibit the actin severing protein Cofilin, resulting in F-actin stabilisation (Chai et al., 2009). Notably, FilaminA and Tropomyosin likewise stabilise F-actin (Dent and Gertler, 2003) as does *Arc* by maintaining Cofilin inhibition (Messaoudi et al., 2007). Thus, Reelin might enhance F-actin stability during cell migration, neurite motility and synapse maturation, i.e. by elevating *Actin*, *Filamin*, *Tropomyosin* and *Arc* mRNA levels, via SRF-dependent gene transcription.

In sum, our data identify SRF as a crucial regulator of hippocampal development. Additionally, we provide three lines of data arguing for a functional interdependence of SRF and Reelin in brain lamination.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Srf (*flex1neo/flex1neo*) and *CamK2 α -iCre* mice were bred to obtain *Srf* mutants (*Srf*^{-/-}; *Camk2a-iCre*) or control littermates (*Srf*^{+/-}, *Srf*^{+/-} or *Srf*^{+/-}; *Camk2a-iCre* (Alberti et al., 2005; Knoll et al., 2006)). *Srf* mutants were crossed with *thy1-GFP* transgenic mice (kindly provided by Dr. J. Sanes, Harvard University; (Feng et al., 2000)). Reeler mice were kindly provided from Dr. M. Frotscher (Institute for Anatomy and Cell Biology, University of Freiburg). Animal experiments and housing were approved by the local ethics committee (Tübingen University).

Neuronal cell culture

Neurons were cultured on poly-L-lysine (100 μ g/ml; Sigma) and laminin (20 μ g/ml; Gibco) coated coverslips (13 mm). P1 hippocampal or E17.5 cortical cultures were incubated in NMEM/B27 medium as described previously (Knoll et al., 2006). Hippocampal cultures from P1-P3 reeler mice (5 x 10³ cells/13 mm coverslip) were infected one day after plating with adenoviral particles expressing either SRF-VP16 Δ MADS (final conc.: 4.9 x 10⁷ PFU/ml) or SRF-VP16 (4.6 x 10⁷ PFU/ml; both custom made by Vector Biolabs). Virus infection efficiency was between 60-70% of all cells. After two additional days in culture, cells were processed for immunocytochemistry (see below). P1-P3 hippocampal cultures from control or *Srf* mutant mice (8 x 10³ cells/ 13 mm coverslip) were incubated for approx. 24h in Reelin or control supernatant (derived of a GFP-expressing cell line; see below). For qRT-PCR, cortical neurons (approx. 10⁶ cells/35 mm dish) were cultured for 3 div prior to stimulation (see below).

Reelin preparation

HEK293 cells stably expressing a Reelin expression vector (pCrl; a kind gift of Dr. T. Curran, Children's Hospital of Philadelphia) and control HEK293 cells expressing GFP were kindly provided by Dr. M. Frotscher (University of Freiburg). HEK293 cells were cultured in DMEM/GlutaMAX (Invitrogen) with 10% fetal calf serum (FCS, PAA) and 0.5 mg/ml G418 (Geneticin, Roth) until they reach full confluence. Medium was then replaced by Opti-MEM (Invitrogen) and cells were incubated for a further 3 days. Supernatants of control and Reelin expressing cells were harvested and centrifuged at 1000 rpm (rounds per minute) for 8 minutes to remove dead cells. For neuronal stimulation in qRT-PCR experiments (Fig. 5), Reelin- or control Opti-MEM supernatants (approx. 1.5 ml/35 mm dish) were immediately applied to cultures. To investigate Reelin-induced neurite branching (Fig. 6), supernatants were concentrated tenfold with centricon columns (Amicon, Millipore) and diluted in NMEM/B27 1:5 in a total volume of 0.5 ml. Reelin expression in supernatants was controlled by Western blotting using a mouse α -Reelin antibody (G10, 1:1000, Chemicon).

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Total RNA derived from tissue or culture was isolated with the RNeasy kit (Qiagen). Reverse transcription was performed with 1 μ g RNA using reverse transcriptase (Promega) and random hexamers. qRT-PCR was performed on ABI PRISM 7700 Sequence Detector with the Power PCR SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems). Expression was determined in relation to *Gapdh* RNA levels. Primer sequences can be obtained upon request. Of note, replacement of NMEM/B27 medium with Opti-MEM medium of a GFP-expressing HEK293 cell line alone already induced some but not all IEGs and not the cytoskeletal genes (see Fig. 5). Importantly, IEG gene induction by Reelin containing Opti-MEM further enhanced this "baseline" IEG response due to the NMEM/B27 to Opti-MEM medium change (Fig. 5, Fig. S4). Therefore, we included for every individual time-point of Reelin stimulation (30 mins – 4h) this Opti-MEM (GFP) control.

Immunohistochemistry

Brains were fixed in 4% PFA and 60 μ m sections were prepared on a vibratome. Slices were blocked for 30 minutes in 5% normal goat serum/ 0.1 % PBST and incubated with the primary antibodies overnight at 4°C as follows: rabbit α -Calretinin (1:5000; Swant), mouse α -Reelin (1:1000; G10, Chemicon), mouse α -Calbindin (1:500; Swant), mouse α -Smi32 (1:1000; Sternberger), rabbit α -Map2 (1:1000; Chemicon), rabbit α -SRF (1:500, Santa Cruz). Sections were incubated for 1h at room temperature with Alexa-conjugated secondary antibodies (1:300), counterstained with DAPI and embedded in Mowiol.

Immunocytochemistry

Cells were fixed for 15 minutes in 4% PFA/5% Sucrose/PBS, permeabilised for 5 minutes in 0.1% Triton-X-100/PBS and blocked for 30 minutes in 2% BSA/PBS. Primary antibodies were incubated 1h at room-temperature as follows: mouse α - β -Tubulin (1:5000; Sigma), mouse α -class III β -Tubulin (1:1000; Covance), rabbit α -VP16 (1:5000; Abcam). First antibodies were detected with Alexa-conjugated secondary antibodies (1:1000; Molecular Probes). Cells were stained for F-actin with Texas Red-X Phalloidin (1:100; Molecular Probes).

Statistics and image acquisition

For all in vivo experiments at least three mice of each control and *Srf* mutant genotype were analysed. We indicated n numbers in the results section or figure (Fig. 5). For cell culture experiments at least three independent experiments employing a minimum of three mice/bar (each control and *Srf* mutant) were analysed. For neurite branching and length (Fig. 6 and 7), we analysed more than 30 neurones/mouse. For spine morphology, more than 3 GFP-positive neurones (with 3 apical and basal dendrites/neurone) per mouse were analysed. Branches and

neurite-length were measured with Axiovision (Zeiss) or Slidebook software (Intelligent Imaging Innovations, Göttingen, Germany). Only neurones (e.g. identified via β III tubulin-positive signals) were taken into account. Pictures were acquired on a confocal (LSM, Zeiss; Fig. 2K, L) or a Zeiss Axiovert 200M microscope (all other Figures) using an Axiocam camera and Axiovision software. Pictures were further processed using Photoshop software (Adobe). Statistical significance was tested using two-tailed t-test with *, **, *** representing $P \leq 0.05, 0.01, 0.001$. Error bars indicate standard deviation except for Fig. 5 (here: S.E.M).

Acknowledgements

The authors are grateful to Daniela Sinske for excellent technical support. We thank A. Wizenmann, A. Nordheim and E. Förster for critically reading the manuscript. B.K. is supported by the DFG through the Emmy Noether-program and SFB 446, the Schram-Stiftung and by young investigator grants of Tübingen University. The authors declare no conflicting financial interests.

REFERENCES

Alberti, S., Krause, S. M., Kretz, O., Philippar, U., Lemberger, T., Casanova, E., Wiebel, F. F., Schwarz, H., Frotscher, M., Schutz, G. et al. (2005). Neuronal migration in the murine rostral migratory stream requires serum response factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 6148-53.

Ayala, R., Shu, T. and Tsai, L. H. (2007). Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. *Cell* **128**, 29-43.

Borrell, V., Del Rio, J. A., Alcantara, S., Derer, M., Martínez, A., D'Arcangelo, G., Nakajima, K., Mikoshiba, K., Derer, P., Curran, T. et al. (1999a). Reelin regulates the development and synaptogenesis of the layer-specific entorhino-hippocampal connections. *J Neurosci* **19**, 1345-58.

Borrell, V., Pujadas, L., Simo, S., Dura, D., Sole, M., Cooper, J. A., Del Rio, J. A. and Soriano, E. (2007). Reelin and mDab1 regulate the development of hippocampal connections. *Mol Cell Neurosci* **36**, 158-73.

Borrell, V., Ruiz, M., Del Rio, J. A. and Soriano, E. (1999b). Development of commissural connections in the hippocampus of reeler mice: evidence of an inhibitory influence of Cajal-Retzius cells. *Exp Neurol* **156**, 268-82.

Chai, X., Forster, E., Zhao, S., Bock, H. H. and Frotscher, M. (2009). Reelin stabilizes the actin cytoskeleton of neuronal processes by inducing n-cofilin phosphorylation at serine3. *J Neurosci* **29**, 288-99.

Chen, S. C., Curran, T. and Morgan, J. I. (1995). Apoptosis in the nervous system: new revelations. *J Clin Pathol* **48**, 7-12.

D'Arcangelo, G. (2006). Reelin mouse mutants as models of cortical development disorders. *Epilepsy Behav* **8**, 81-90.

D'Arcangelo, G., Homayouni, R., Keshvara, L., Rice, D. S., Sheldon, M. and Curran, T. (1999). Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron* **24**, 471-9.

D'Arcangelo, G., Miao, G. G., Chen, S. C., Soares, H. D., Morgan, J. I. and Curran, T. (1995). A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature* **374**, 719-23.

Del Rio, J. A., Heimrich, B., Borrell, V., Forster, E., Drakew, A., Alcantara, S., Nakajima, K., Miyata, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K. et al. (1997). A role for Cajal-Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections. *Nature* **385**, 70-4.

Deller, T., Drakew, A., Heimrich, B., Forster, E., Tielsch, A. and Frotscher, M. (1999). The hippocampus of the reeler mutant mouse: fiber segregation in area CA1 depends on the position of the postsynaptic target cells. *Exp Neurol* **156**, 254-67.

Dent, E. W. and Gertler, F. B. (2003). Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* **40**, 209-27.

Drakew, A., Deller, T., Heimrich, B., Gebhardt, C., Del Turco, D., Tielsch, A., Forster, E., Herz, J. and Frotscher, M. (2002). Dentate granule cells in reeler mutants and VLDLR and ApoER2 knockout mice. *Exp Neurol* **176**, 12-24.

Dulabon, L., Olson, E. C., Taglienti, M. G., Eisenhuth, S., McGrath, B., Walsh, C. A., Kreidberg, J. A. and Anton, E. S. (2000). Reelin binds alpha3beta1 integrin and inhibits neuronal migration. *Neuron* **27**, 33-44.

Etkin, A., Alarcon, J. M., Weisberg, S. P., Touzani, K., Huang, Y. Y., Nordheim, A. and Kandel, E. R. (2006). A Role in Learning for SRF: Deletion in the Adult Forebrain Disrupts LTD and the Formation of an Immediate Memory of a Novel Context. *Neuron* **50**, 127-43.

Feng, G., Mellor, R. H., Bernstein, M., Keller-Peck, C., Nguyen, Q. T., Wallace, M., Nerbonne, J. M., Lichtman, J. W. and Sanes, J. R. (2000). Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* **28**, 41-51.

Forster, E., Jossin, Y., Zhao, S., Chai, X., Frotscher, M. and Goffinet, A. M. (2006a). Recent progress in understanding the role of Reelin in radial neuronal migration, with specific emphasis on the dentate gyrus. *Eur J Neurosci* **23**, 901-9.

Forster, E., Tielsch, A., Saum, B., Weiss, K. H., Johanssen, C., Graus-Porta, D., Muller, U. and Frotscher, M. (2002). Reelin, Disabled 1, and beta 1 integrins are required for the formation of the radial glial scaffold in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13178-83.

Forster, E., Zhao, S. and Frotscher, M. (2006b). Laminating the hippocampus. *Nat Rev Neurosci* **7**, 259-67.

Frotscher, M., Haas, C. A. and Forster, E. (2003). Reelin controls granule cell migration in the dentate gyrus by acting on the radial glial scaffold. *Cereb Cortex* **13**, 634-40.

Frotscher, M., Zhao, S. and Forster, E. (2007). Development of cell and fiber layers in the dentate gyrus. *Prog Brain Res* **163**, 133-42.

Hack, I., Bancila, M., Loulier, K., Carroll, P. and Cremer, H. (2002). Reelin is a detachment signal in tangential chain-migration during postnatal neurogenesis. *Nat Neurosci* **5**, 939-45.

Hartfuss, E., Forster, E., Bock, H. H., Hack, M. A., Leprince, P., Luque, J. M., Herz, J., Frotscher, M. and Gotz, M. (2003). Reelin signaling directly affects radial glia morphology and biochemical maturation. *Development* **130**, 4597-609.

Herz, J. and Chen, Y. (2006). Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* **7**, 850-9.

Hiesberger, T., Trommsdorff, M., Howell, B. W., Goffinet, A., Mumby, M. C., Cooper, J. A. and Herz, J. (1999). Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron* **24**, 481-9.

Jossin, Y. and Goffinet, A. M. (2007). Reelin signals through phosphatidylinositol 3-kinase and Akt to control cortical development and through mTor to regulate dendritic growth. *Mol Cell Biol* **27**, 7113-24.

Kalita, K., Kharebava, G., Zheng, J. J. and Hetman, M. (2006). Role of megakaryoblastic acute leukemia-1 in ERK1/2-dependent stimulation of serum response factor-driven transcription by BDNF or increased synaptic activity. *J Neurosci* **26**, 10020-32.

Knoll, B., Kretz, O., Fiedler, C., Alberti, S., Schutz, G., Frotscher, M. and Nordheim, A. (2006). Serum response factor controls neuronal circuit assembly in the hippocampus. *Nat Neurosci* **9**, 195-204.

Knoll, B. and Nordheim, A. (2009). Functional versatility of transcription factors in the nervous system: the SRF paradigm. *Trends Neurosci* **32**, 432-42.

Li, G. and Pleasure, S. J. (2005). Morphogenesis of the dentate gyrus: what we are learning from mouse mutants. *Dev Neurosci* **27**, 93-9.

Matsuki, T., Pramatarova, A. and Howell, B. W. (2008). Reduction of Crk and CrkL expression blocks reelin-induced dendritogenesis. *J Cell Sci* **121**, 1869-75.

Messaoudi, E., Kanhema, T., Soule, J., Tiron, A., Dageyte, G., da Silva, B. and Bramham, C. R. (2007). Sustained Arc/Arg3.1 synthesis controls long-term potentiation consolidation through regulation of local actin polymerization in the dentate gyrus in vivo. *J Neurosci* **27**, 10445-55.

Meyer, G., Cabrera Socorro, A., Perez Garcia, C. G., Martinez Millan, L., Walker, N. and Caput, D. (2004). Developmental roles of p73 in Cajal-Retzius cells and cortical patterning. *J Neurosci* **24**, 9878-87.

Miano, J. M., Long, X. and Fujiwara, K. (2007). Serum response factor: master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C70-81.

Miao, G. G., Smeyne, R. J., D'Arcangelo, G., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Morgan, J. I. and Curran, T. (1994). Isolation of an allele of reeler by insertional mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11050-4.

Miyashita, T., Kubik, S., Lewandowski, G. and Guzowski, J. F. (2008). Networks of neurons, networks of genes: an integrated view of memory consolidation. *Neurobiol Learn Mem* **89**, 269-84.

Nair, P., Muthukumar, S., Sells, S. F., Han, S. S., Sukhatme, V. P. and Rangnekar, V. M. (1997). Early growth response-1-dependent apoptosis is mediated by p53. *J Biol Chem* **272**, 20131-8.

Niu, S., Renfro, A., Quattrocchi, C. C., Sheldon, M. and D'Arcangelo, G. (2004). Reelin promotes hippocampal dendrite development through the VLDLR/ApoER2-Dab1 pathway. *Neuron* **41**, 71-84.

Niu, S., Yabut, O. and D'Arcangelo, G. (2008). The Reelin signaling pathway promotes dendritic spine development in hippocampal neurons. *J Neurosci* **28**, 10339-48.

Posern, G. and Treisman, R. (2006). Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction. *Trends Cell Biol* **16**, 588-96.

Ramanan, N., Shen, Y., Sarsfield, S., Lemberger, T., Schutz, G., Linden, D. J. and Ginty, D. D. (2005). SRF mediates activity-induced gene expression and synaptic plasticity but not neuronal viability. *Nat Neurosci* **8**, 759-67.

Rice, D. S. and Curran, T. (2001). Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annu Rev Neurosci* **24**, 1005-39.

Sanada, K., Gupta, A. and Tsai, L. H. (2004). Disabled-1-regulated adhesion of migrating neurons to radial glial fiber contributes to neuronal positioning during early corticogenesis. *Neuron* **42**, 197-211.

Schratt, G., Philippar, U., Berger, J., Schwarz, H., Heidenreich, O. and Nordheim, A. (2002). Serum response factor is crucial for actin cytoskeletal organization and focal adhesion assembly in embryonic stem cells. *J Cell Biol* **156**, 737-50.

Simo, S., Pujadas, L., Segura, M. F., La Torre, A., Del Rio, J. A., Urena, J. M., Comella, J. X. and Soriano, E. (2007). Reelin induces the detachment of postnatal subventricular zone cells and the expression of the Egr-1 through Erk1/2 activation. *Cereb Cortex* **17**, 294-303.

Soriano, E. and Del Rio, J. A. (2005). The cells of cajal-retzius: still a mystery one century after. *Neuron* **46**, 389-94.

Sotiropoulos, A., Gineitis, D., Copeland, J. and Treisman, R. (1999). Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics. *Cell* **98**, 159-69.

Stern, S., Debre, E., Stritt, C., Berger, J., Posern, G. and Knoll, B. (2009). A nuclear actin function regulates neuronal motility by serum response factor-dependent gene transcription. *J Neurosci* **29**, 4512-8.

Stritt, C., Stern, S., Harting, K., Manke, T., Sinske, D., Schwarz, H., Vingron, M., Nordheim, A. and Knoll, B. (2009). Paracrine control of oligodendrocyte differentiation by SRF-directed neuronal gene expression. *Nat Neurosci* **12**, 418-27.

Tedeschi, A. and Di Giovanni, S. (2009). The non-apoptotic role of p53 in neuronal biology: enlightening the dark side of the moon. *EMBO Rep* **10**, 576-83.

Tissir, F. and Goffinet, A. M. (2003). Reelin and brain development. *Nat Rev Neurosci* **4**, 496-505.

Trommsdorff, M., Gotthardt, M., Hiesberger, T., Shelton, J., Stockinger, W., Nimpf, J., Hammer, R. E., Richardson, J. A. and Herz, J. (1999). Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell* **97**, 689-701.

Weiss, K. H., Johansen, C., Tielsch, A., Herz, J., Deller, T., Frotscher, M. and Forster, E. (2003). Malformation of the radial glial scaffold in the dentate gyrus of reeler mice, scrambler mice, and ApoER2/VLDLR-deficient mice. *J Comp Neurol* **460**, 56-65.

Wickramasinghe, S. R., Alvania, R. S., Ramanan, N., Wood, J. N., Mandai, K. and Ginty, D. D. (2008). Serum Response Factor Mediates NGF-Dependent Target Innervation by Embryonic DRG Sensory Neurons. *Neuron* **58**, 532-45.

Zhao, S., Chai, X., Forster, E. and Frotscher, M. (2004). Reelin is a positional signal for the lamination of dentate granule cells. *Development* **131**, 5117-25.

Zhao, S., Chai, X. and Frotscher, M. (2007). Balance between neurogenesis and gliogenesis in the adult hippocampus: role for reelin. *Dev Neurosci* **29**, 84-90.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: SRF controls cell body and fibre lamination in the dentate gyrus

(A, B) In control (A) and *Srf* mutant mice (B), mossy fibres (green) were highlighted by GFP expression via the *Thy1* promoter of transgenic mice. In control (A), mossy fibres navigated in either the suprapyramidal (arrows) or infrapyramidal (arrowheads) blade outside stratum pyramidale (str. pyr.). Contrastingly, in *Srf* mutants (B) mossy fibres navigated in between cell-bodies of stratum pyramidale rather than growing outside.

(C-F) Using *Thy1*-GFP mice, a subpopulation of DG granule cells was visualised in control (C, E) and *Srf* mutant mice (D, F). C/A fibres were stained with Calretinin in red. In control mice, essentially all GFP-positive granule cells were localised underneath the C/A fibres (indicated by arrows in (E)). In contrast, GFP-positive granule cells in *Srf* mutants were intermingled with C/A fibres (arrows in (F)) which were not found in a tight bundle as seen for control mice (C, E). Notably, GFP-positive granule cell neurones in *Srf* mutants were aberrantly positioned above the DAPI-positive granule cell layer (D); arrowheads in (F)).

(G-L) All granule cell neurones were visualised using Calbindin (green) as a marker, in parallel with Calretinin staining (red) highlighting C/A fibres (arrows in (I)). In control mice, Calbindin-positive cells (green) were embedded by the Calretinin-positive C/A fibre layer (arrows in (K)) and neurones in the hilus/ subgranular zone (arrowhead in (K)). In opposite, in *Srf* mutants (J, L) granule cell neurones were more dispersed and found within or above C/A fibres.

Abbreviations: GCL, granule cell layer; PCL, pyramidal cell layer

Scale-bar: (A, B) = 200 μ m; (C-L) = 50 μ m

Figure 2: Aberrant dendrite arborisation and spine formation in *Srf* mutant hippocampi

(A, B) SRF is strongly expressed in wild-type CA1 pyramidal neurones (A). Cre-mediated recombination effectively diminished SRF immunoreactivity in CA1 neurones of *Srf* mutants (B).

(C, D) Dendritic arborisations were visualised in a subpopulation of CA1 pyramidal neurones in *Thy1*-GFP transgenic mice. In wild-type (C), CA1 pyramidal neurones elaborate dendritic arborisations above (basal) and below (apical) the DAPI-positive cell body layer. In *Srf* mutants (D), complexity of dendritic arborisations was decreased. Additionally, ectopic dendritic protrusions were observed within the DAPI-positive cell body layer ((D); see also (E-H)).

(E-H) Higher magnifications of results obtained in (C, D). In control mice (E, G), dendrites were formed in a stereotypical fashion by assembling a basal and apical dendritic tuft. In wild-type, dendrites do not protrude within the DAPI-positive cell body layer (arrows in E, G; dashed lines label the cell body layer). In *Srf* mutants, dendrites were ectopically localised within the DAPI-positive cell body layer (arrows in F, H).

(I, J) Dendrites of all CA1 neurones were highlighted with anti-MAP2 antibodies in control (I) and *Srf* mutant (J) CA1 layer. In *Srf* mutants (J), dendritic arborisation is strongly reduced compared to control mice (I).

(K, L) Dendritic spine formation was investigated using *Thy1*-GFP transgenic mice interbred with wild-type (K) or *Srf* mutant mice (L). In wild-type mice (K), dendritic spine number exceeded those of *Srf* mutant dendrites (L). Inserts are higher magnifications.

Scale-bar: (A, B, E-J) = 20 μm ; (C, D) = 50 μm ; (K, L) = 5 μm

Figure 3: Reelin-positive cells are misplaced in *Srf* mutant hippocampi

(A, B) Overview of Reelin distribution in the hippocampus of wild-type (A) and *Srf* mutants (B). In Cajal-Retzius cells, arranged in the dentate gyrus molecular layer (arrowheads), no obvious changes in Reelin expression were noticed between

genotypes. Contrastingly, Reelin-positive cells entered the CA1 cell body region of *Srf* mutants (arrows in (B)), whereas in wild-type (arrows in (A)) they remained restricted to areas outside CA1 (indicated by the dashed lines in (A) and (B)).

(C-H) In wild-type mice (C, E, G), Reelin-positive cells is confined to positions above the CA1 stratum pyramidale (indicated by dashed lines) where Reelin localises close to dendrites. In *Srf* mutants (D, F, H), additional Reelin-positive cells enter CA1 stratum pyramidale (arrows in (D) and (H)). Thus, in *Srf* mutants, ectopic dendritic arborisations inside Stratum pyramidale are surrounded by Reelin-expressing cells.

(I-L) Quantification of Reelin localisation in stratum oriens (I, J) and stratum pyramidale (K, L) at P7 (I, K) and P12 (J, L).

Scale-bar: (A, B) = 100 μm ; (C-H) = 20 μm

Figure 4: SRF is not a major transcriptional regulator of components of the Reelin signalling cascade

Hippocampi of control (black bars) and *Srf* mutant mice (white bars) isolated at two time points (P6 and P14) were subjected to RNA isolation. cDNA was used in quantitative real-time PCR using primers for genes indicated. *Srf* was down-regulated approximately two-fold in conditional SRF-deficient mice. Neither Reelin, its receptors *ApoEr2* and *Vldlr*, nor expression of the signalling adaptor *Dab1* was affected on mRNA level in *Srf* mutants compared to control. Similarly, further signalling mediators associated with Reelin signalling (*Crk*, *Crkl*, *Lis1* and *p35*) were unaffected by SRF ablation. However, mRNA levels of both, the microtubule associated protein Doublecortin (*Dcx*) and the actin cross-linker FilaminA were down-regulated in *Srf* mutants.

Figure 5: Reelin elevates IEG and cytoskeletal mRNA levels through SRF

Cortical cultures derived from wild-type (black bars) or *Srf* mutants (white bars) were stimulated with Reelin-containing or control supernatant for the indicated time-points. RNA was subsequently isolated and cDNA subjected to qPCR using primers to genes indicated. Reelin increased mRNA abundance of the IEGs *Srf* (A), *Arc* (B), *c-fos* (C), *Egr1* (D), *Egr2* (E) and *Egr3* (F) to a variable extent. In addition to IEGs, Reelin induces mRNA levels of cytoskeletal genes including *Acta* (G), *Tropomyosin 2B* (H) and *Filamin A* (I). *p53* levels are suppressed by Reelin in both wild-type and *Srf* mutant neurones (J). In *Srf* mutants, Reelin does not up-regulate mRNA levels of IEGs and cytoskeletal genes, indicating that SRF is the transcriptional regulator mediating Reelin stimulation. Statistical significance was calculated by comparing values of control with respective Reelin containing media. Numbers in bars indicate numbers of animals analysed.

Figure 6: Reelin-stimulated neurite elongation and branching requires SRF

- (A) Wild-type hippocampal neurones stained for F-actin (red) and β III tubulin (green) were incubated in control supernatant derived of a GFP-expressing HEK293 cell line for 24h.
- (B) *Srf* mutant neurones – in the presence of control supernatant – are compared to control (A) shorter and contain fewer branches.
- (C) Addition of Reelin to wild-type neurones increases average neurite length and number of branches (see quantification in (E, F)).
- (D) In SRF-deficient cultures, exogenous Reelin fails to elevate neurite length and branch number, indicating that Reelin signalling requires SRF activity to modulate neurone morphology.
- (E, F) Quantification of average neurite length (E) and average branch number/ neurone (F) upon the various conditions.

Scale-bar (A-D) = 50 μ m

Figure 7: SRF-VP16 rescues impaired neurite outgrowth in reeler mutants

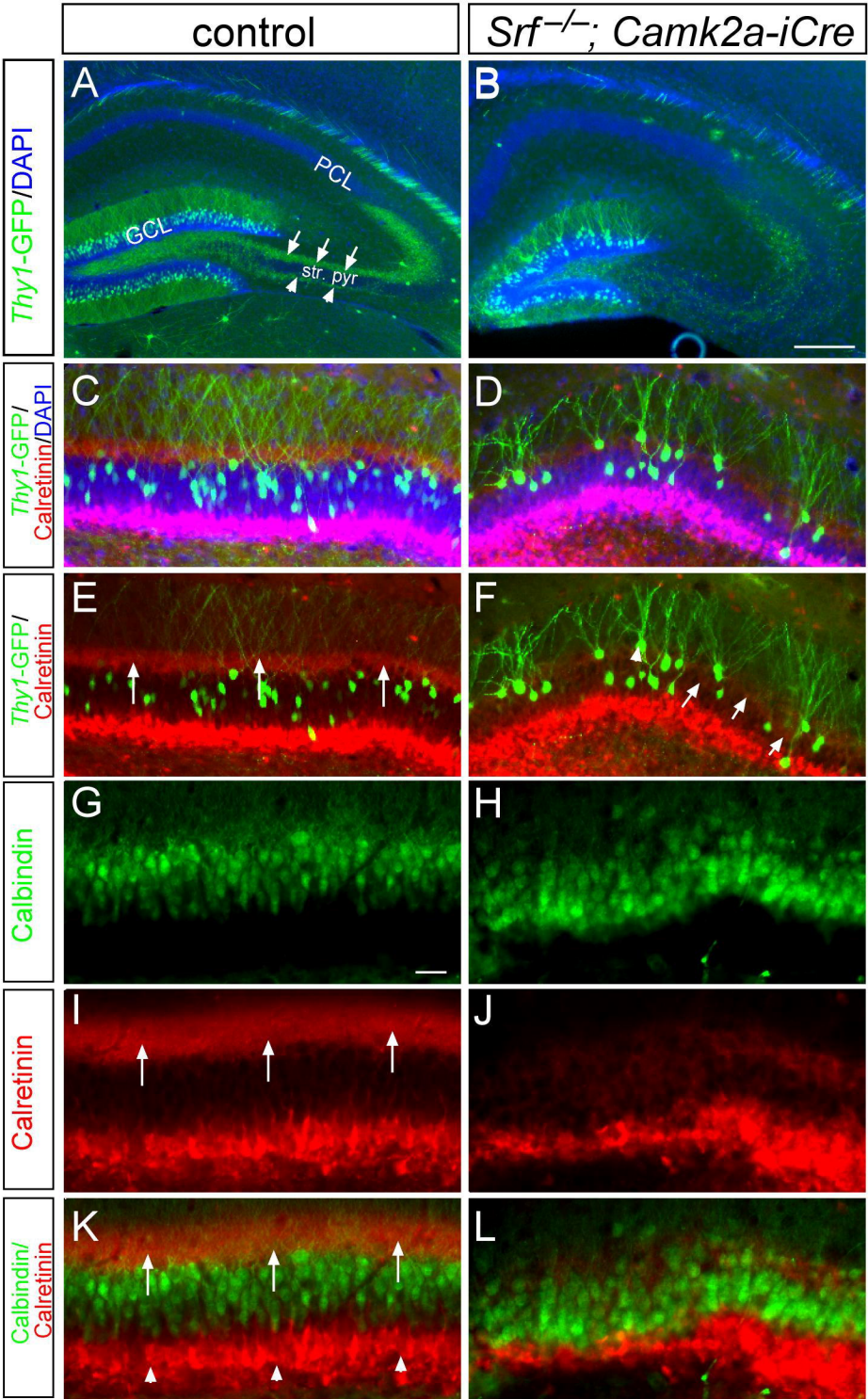
Neurons were stained for tubulin (green) and expression of the SRF constructs via antibodies directed to the VP16 domain (red) of the fusion protein.

(A, C) Wild-type (A) and neurons lacking Reelin (C) were infected with adenoviruses expressing the SRF control construct SRF-VP16 Δ MADS (lacking DNA binding activity). Typically, wild-type neurons (A) elaborate more and longer neurites than neurons lacking Reelin (C).

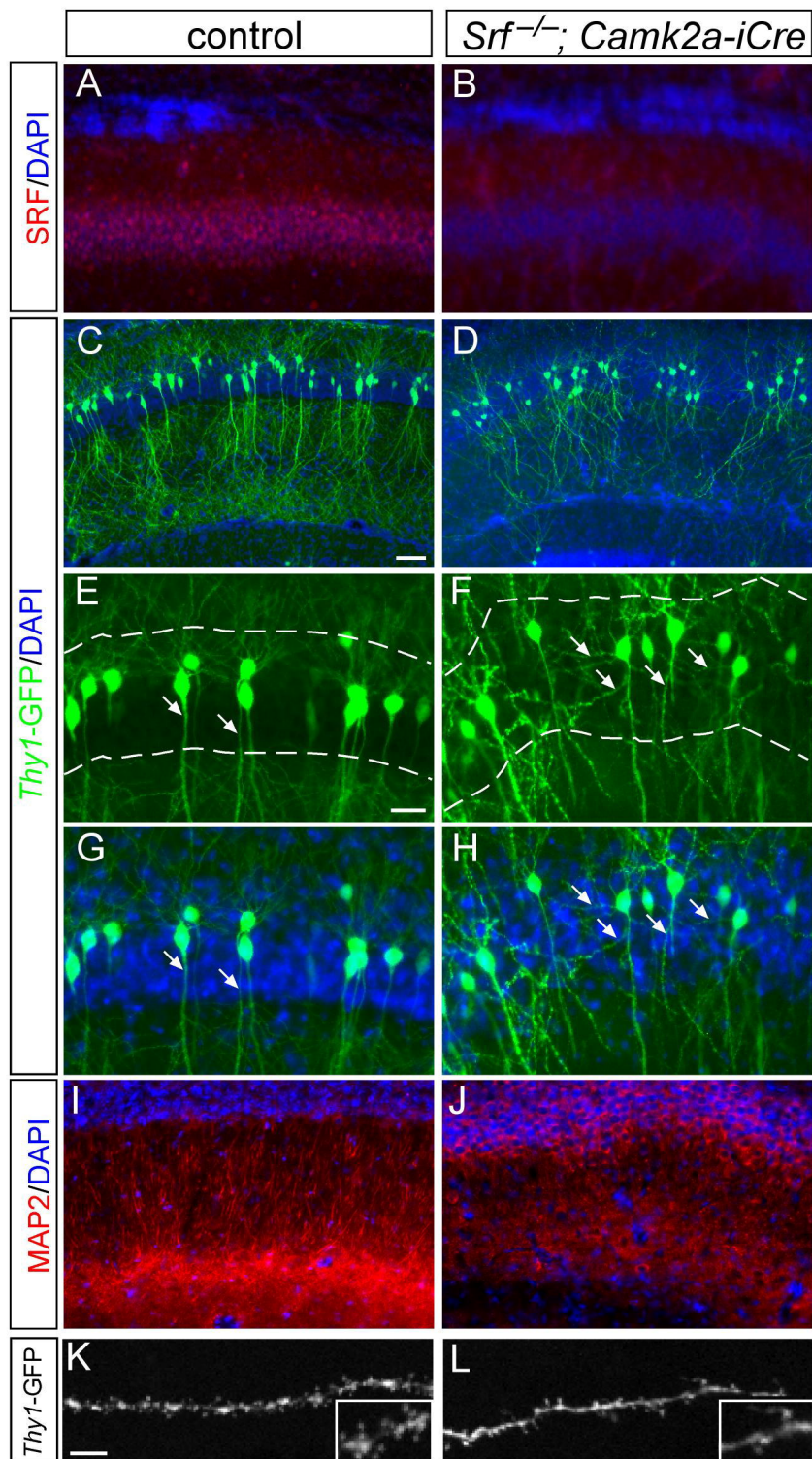
(B, D) Wild-type (B) and reeler (D) cultures were infected with constitutively-active SRF-VP16. In Reelin-deficient neurons, SRF-VP16 strongly increases neurite-outgrowth almost reaching levels observed for wild-type cultures.

(E) Quantification of neurite-outgrowth in wild-type and reeler hetero- and homozygous cultures. For quantification of neurite-outgrowth, neurite length was determined by slidebook software depicting numbers of tubulin pixels/ DAPI-positive neurone.

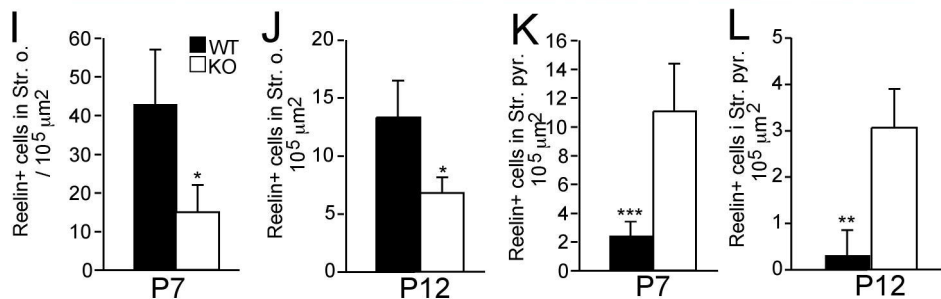
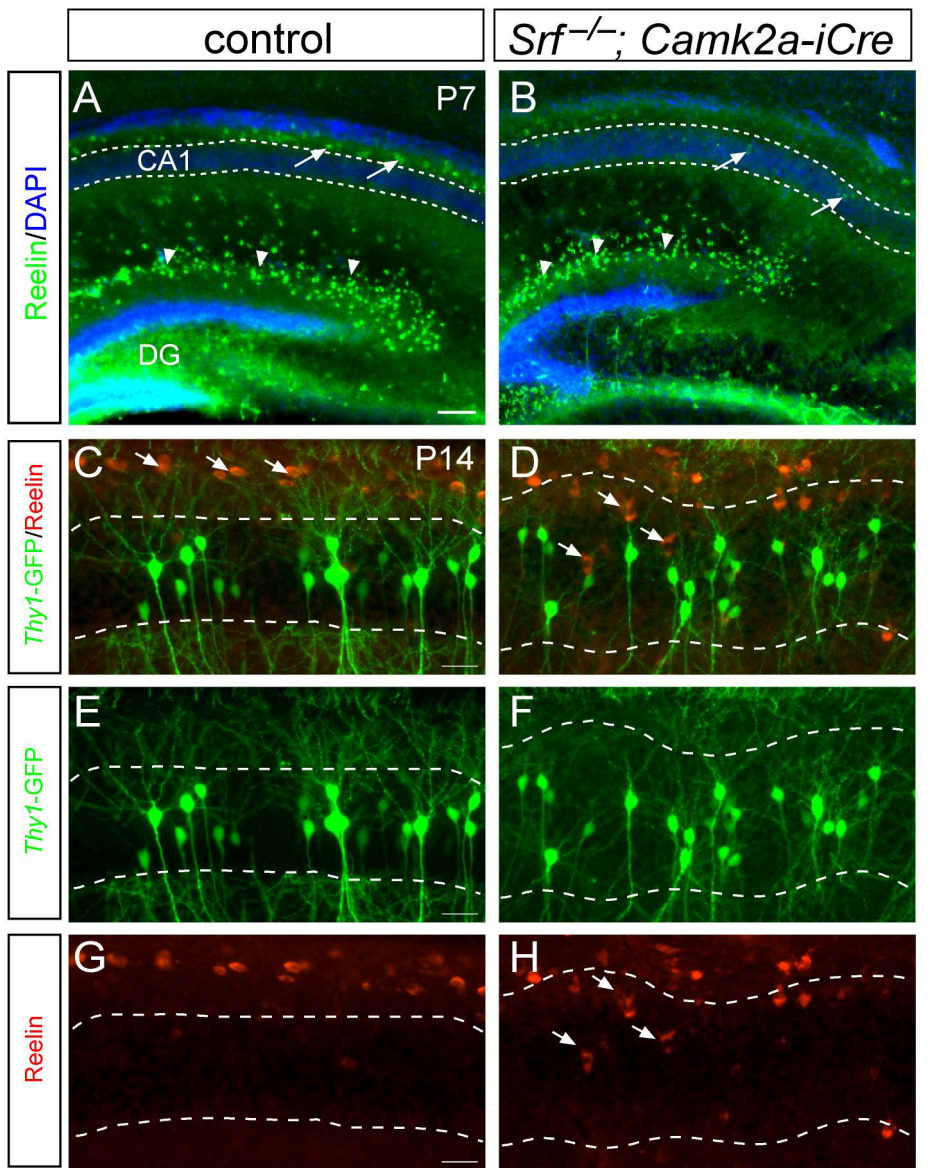
Scale-bar (A-D) = 100 μ m



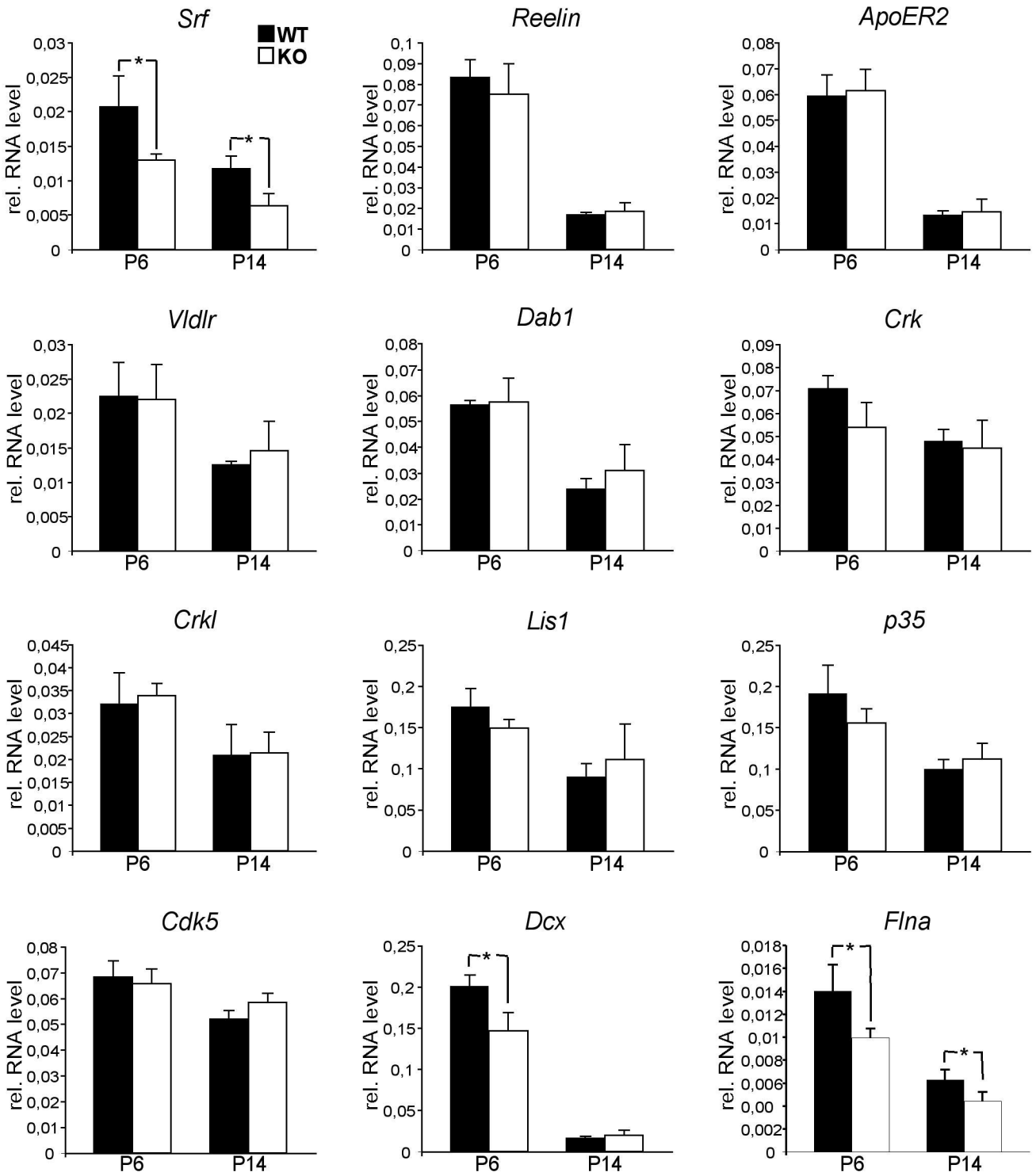
Stritt and Knöll
Fig. 1



Stritt and Knöll
Fig. 2



Stritt and Knöll
Fig. 3



Stritt and Knöll
Fig. 4

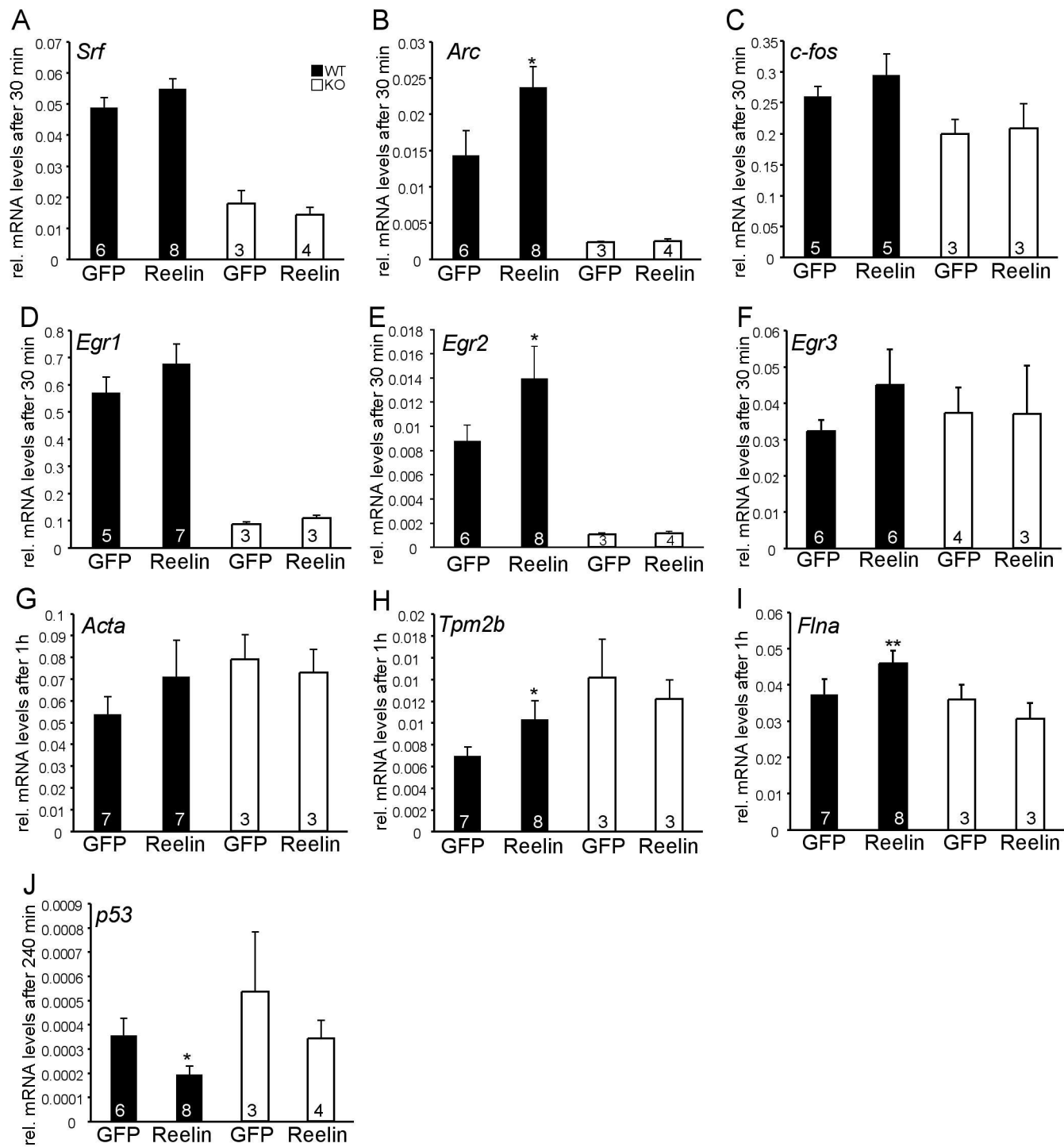
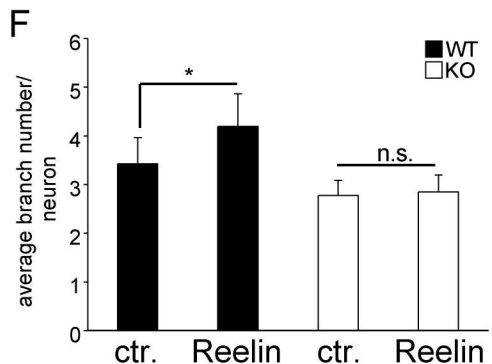
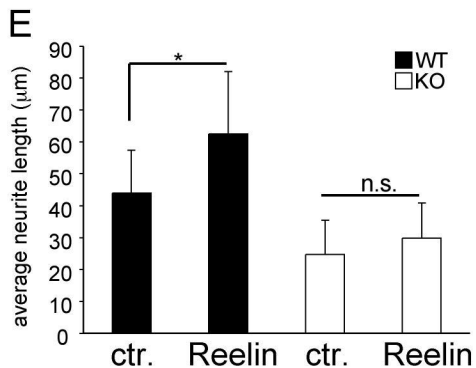
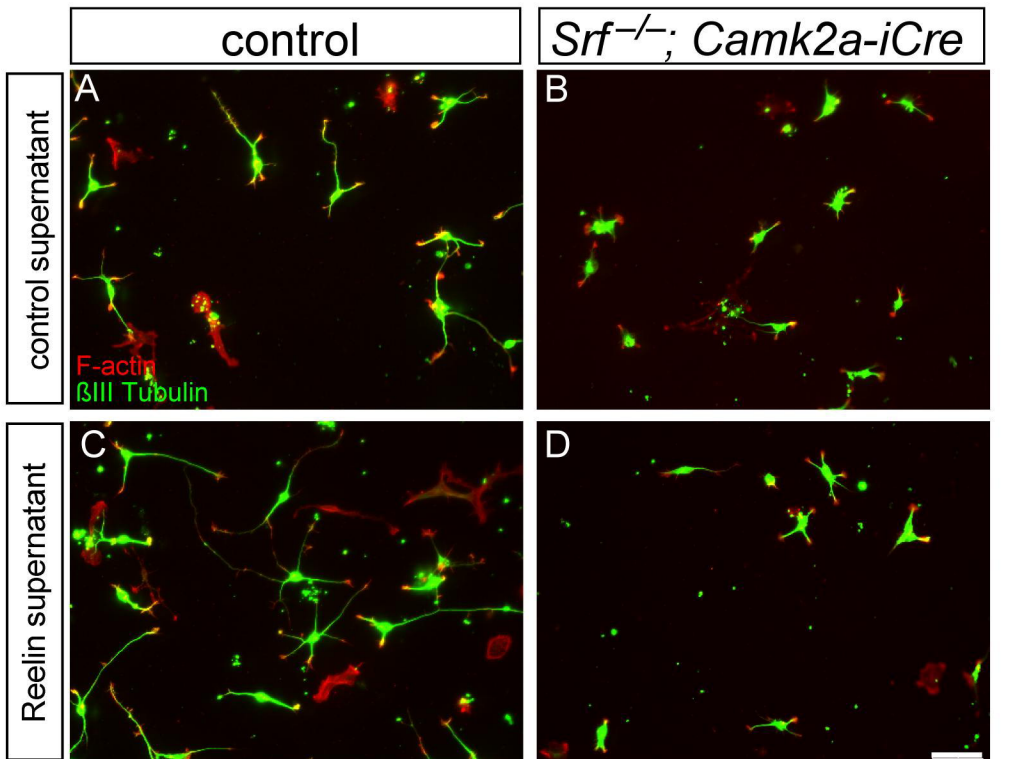
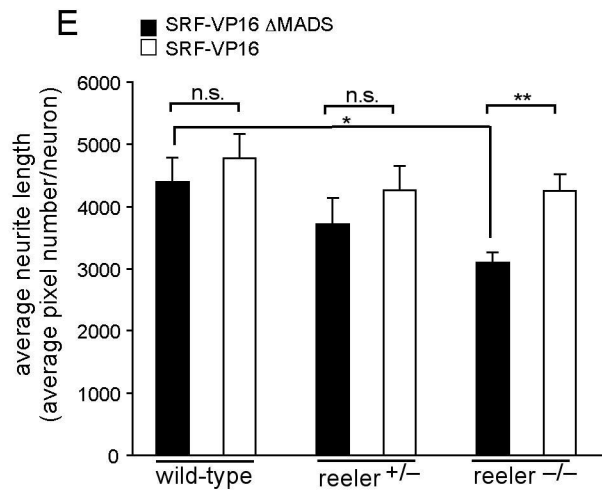
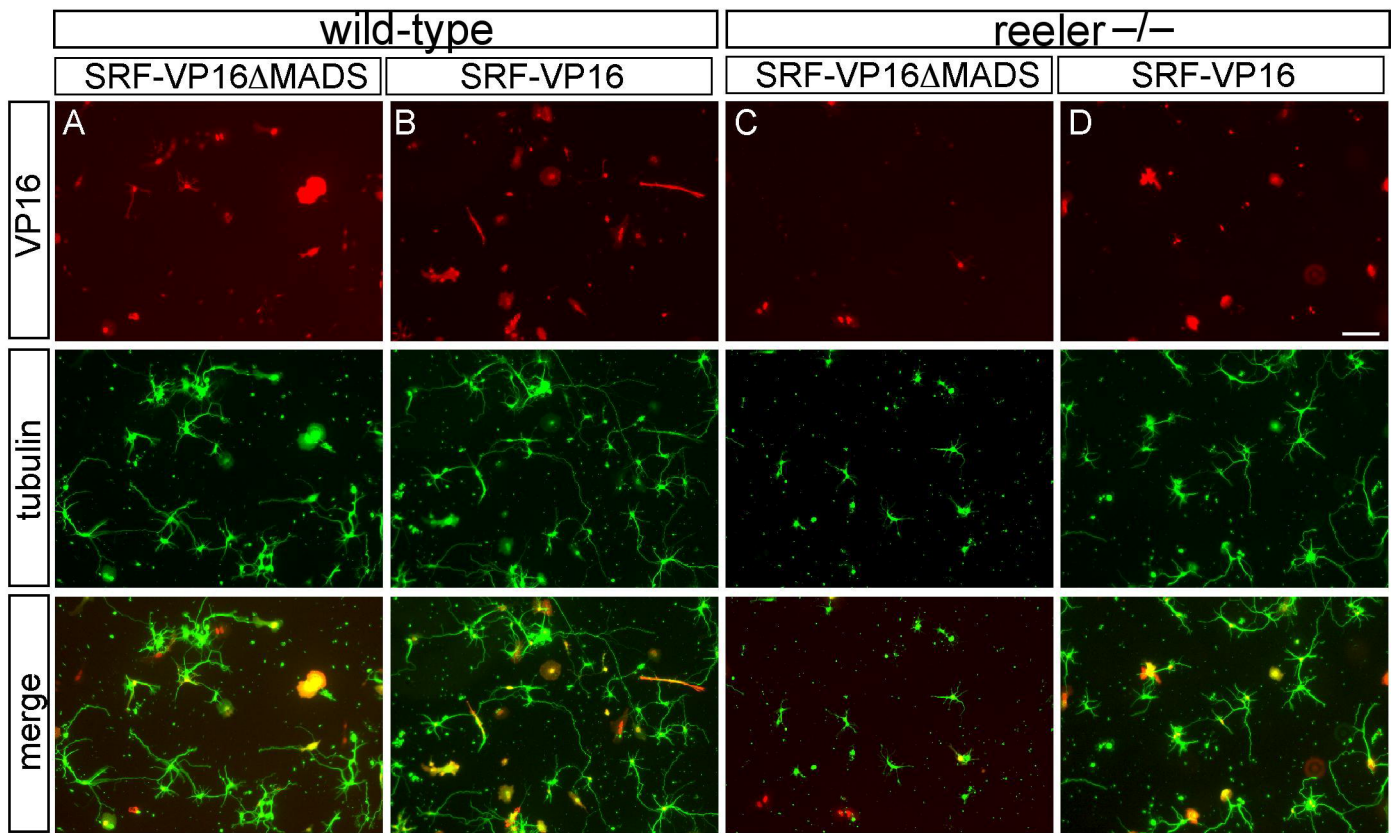


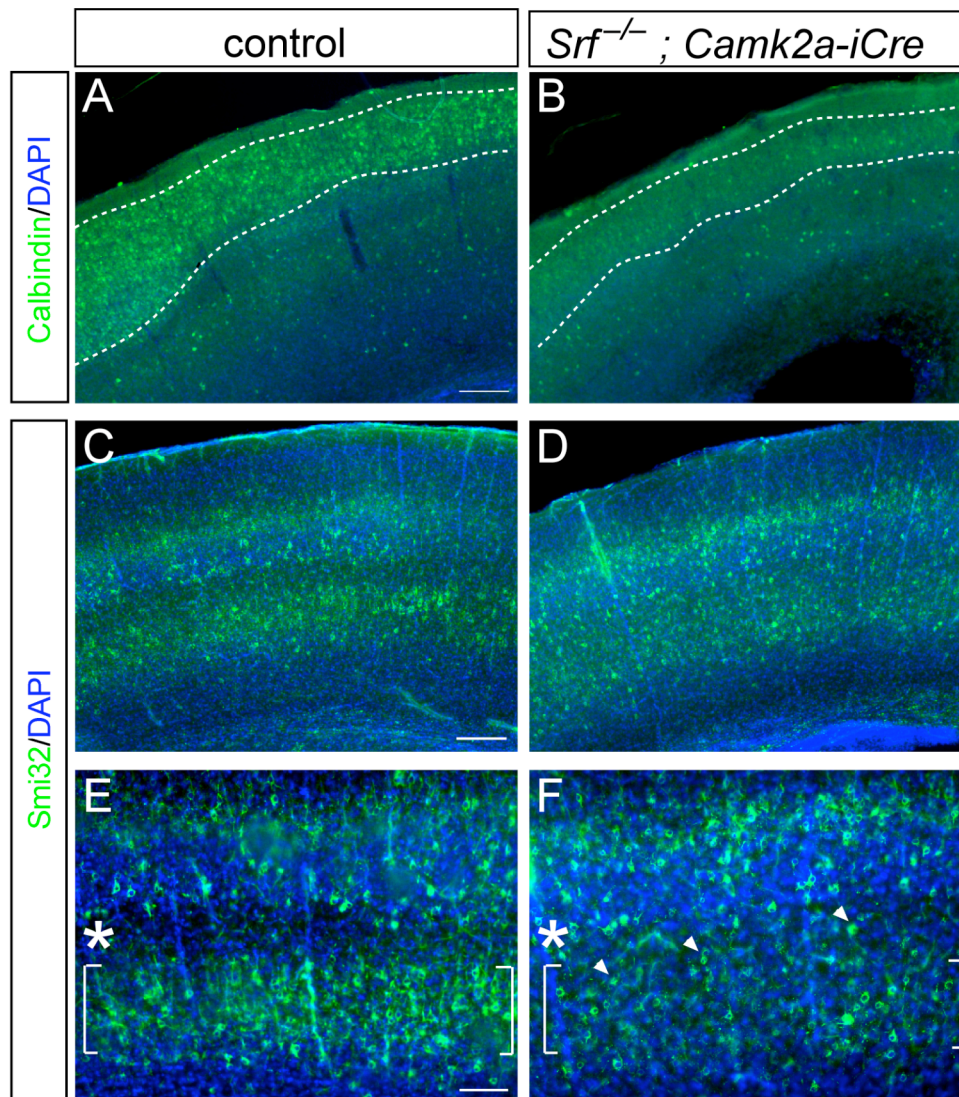
Fig. 5
Stritt and Knöll



Stritt and Knöll
Fig. 6



Supplemental Figure S1



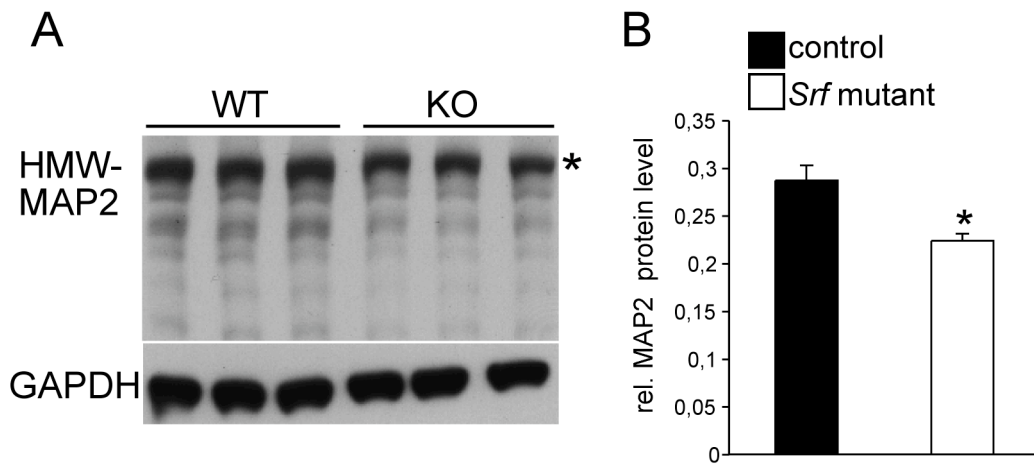
Impaired cell layering in the *Srf* mutant cortex

A, B) P14 cortices were stained for Calbindin, an interneuron and pyramidal cell marker. In wild-type (A), Calbindin-positive cells localise to upper cortical layers. Contrastingly, fewer cells populate the *Srf* mutant cortex (B). In lower cortex layers, no alterations were noted.

C-F) Smi32 labels layer III and layer V pyramidal neurons. In wild-type (C, E), Smi32-positive neurons segregated into layer III and V (indicated by brackets) leaving a Smi32-free zone in between (asterisk). In *Srf* mutants (D, F), layer V contained fewer Smi32 positive cells. Instead many Smi32-positive neurons gathered between layer III and V (arrowheads).

Scale-bar (A-D) = 200 μ m, (E, F) = 100 μ m

Supplemental Figure S2

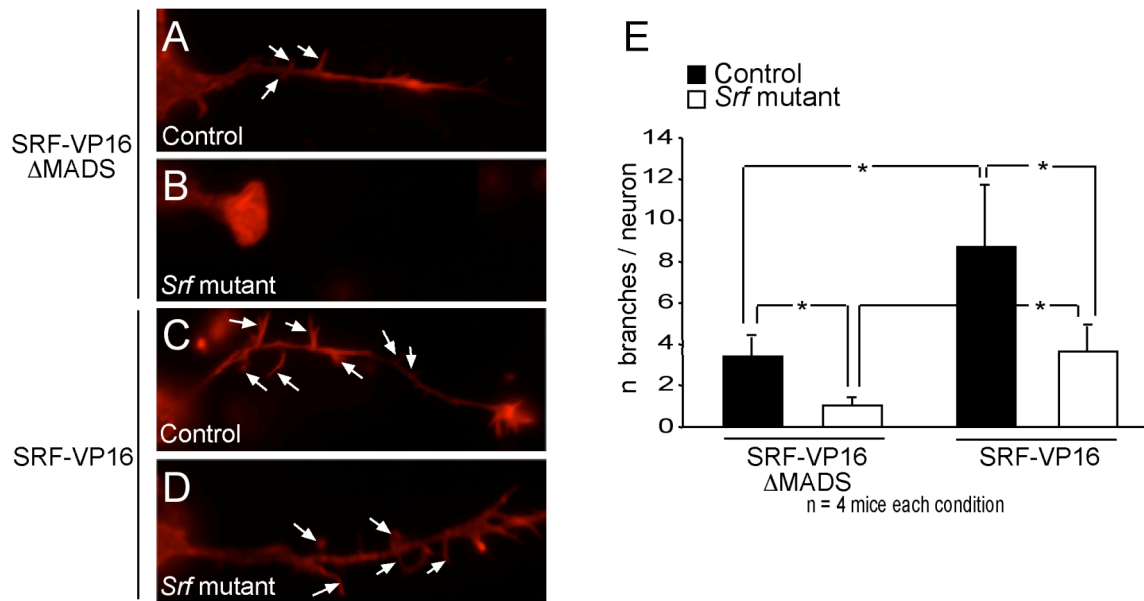


Overall dendritic complexity is slightly reduced in *Srf* mutant hippocampi

A) Entire hippocampi derived of three P14 wild-type or *Srf* mutant animals were lysed and subjected to western-blotting for MAP2, a dendrite marker. High molecular weight (HMW) MAP2 (asterisk) was slightly reduced upon SRF ablation compared to wild-type samples.

B) Quantification of the HMW-MAP2 band only reveals slight, yet statistically significant, down-regulation of this dendrite marker in *Srf* mutants.

Supplemental Figure S3

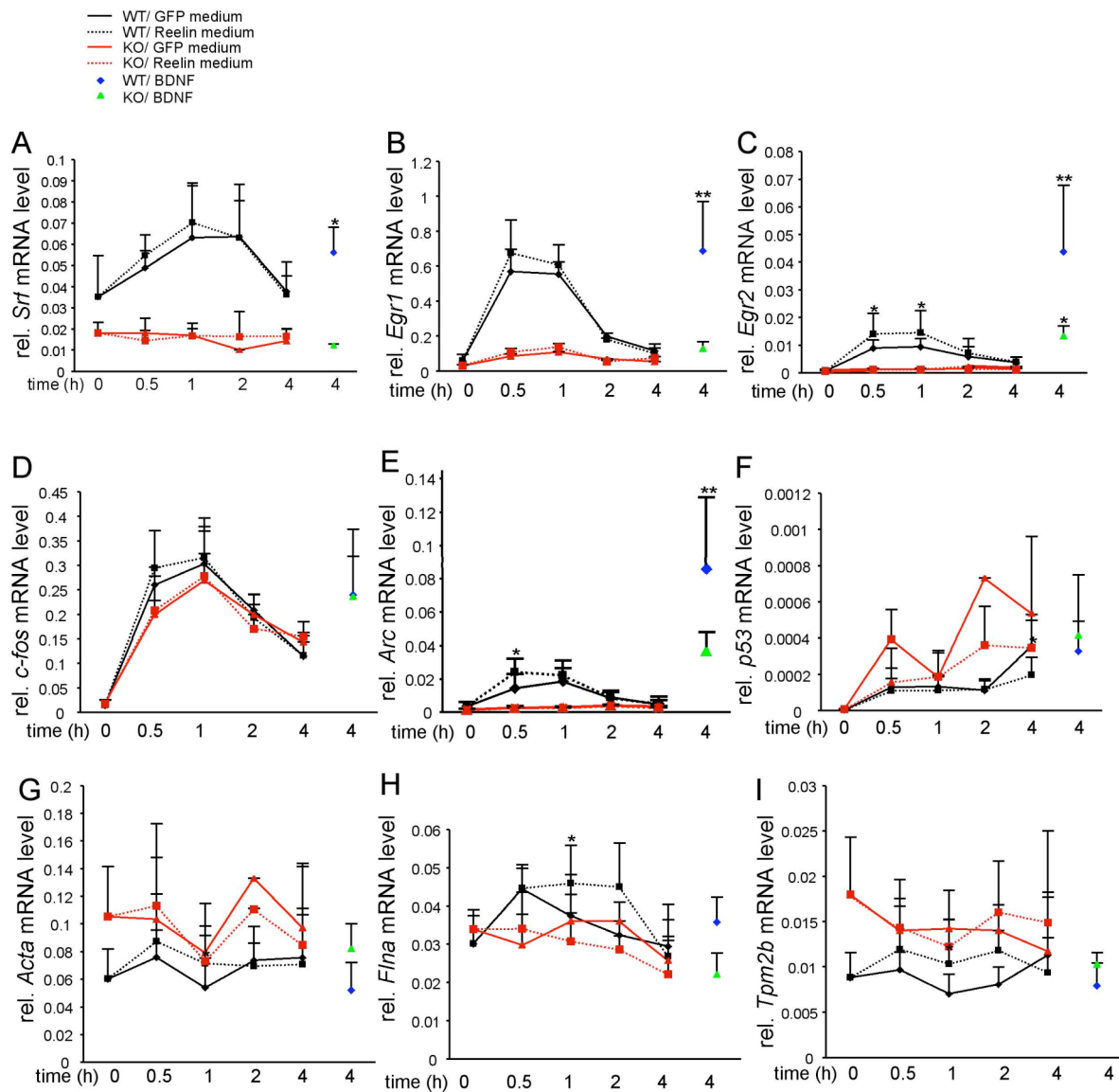


SRF-VP16 induces branch formation in hippocampal neurons

A-D) Hippocampal neurons derived of wild-type (A, C) or *Srf* mutants (B, D) were stained with Phalloidin to visualise F-actin containing branches. Neurons were electroporated with 3 μ g of SRF-VP16 Δ MADS, a SRF fusion protein lacking the DNA binding domain used as control (A, B). Alternatively, neurons were electroporated with constitutively-active SRF – SRF-VP16 – a fusion protein of wild-type SRF and the viral VP16 transactivation domain (C, D). SRF-VP16 increased branch number (arrows point at individual branches) both in wild-type and SRF-deficient neurons compared to the control construct SRF-VP16 Δ MADS.

E) Quantification of results presented in (A-D). The number of branches per neuron were quantified in cultures derived from 4 different mice/condition.

Supplemental Figure S4

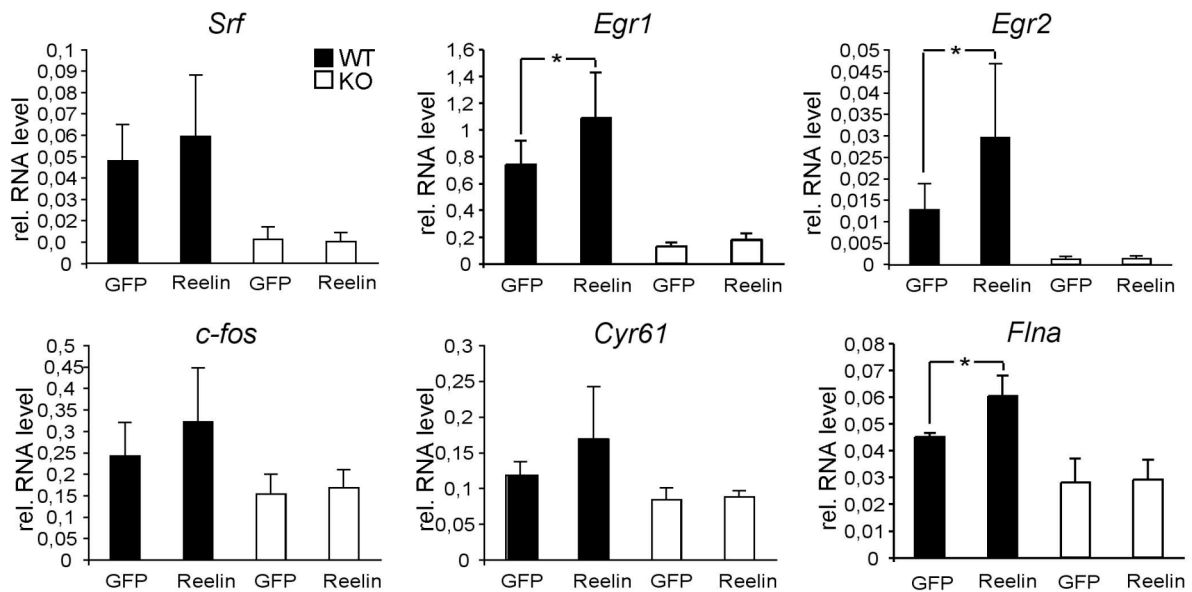


Reelin induces IEG and cytoskeletal gene expression through SRF

Cortical cultures derived from wild-type (black lines and blue diamonds) or *Srf* mutants (red lines and green triangles) were stimulated with Reelin-containing or control supernatant (dotted lines) or BDNF (green triangles or blue diamonds) for the indicated time-points. RNA was subsequently isolated and cDNA subjected to qPCR using primers to genes indicated. Note that addition of a control medium by itself already induced IEG mRNA levels, which however was further augmented by Reelin containing medium. Reelin and more pronounced BDNF transiently induced the IEGs *Srf* (A), *Egr1* (B), *Egr2* (C), *c-Fos* (D) and *Arc* (E) in a

predominantly SRF-dependent manner. *p53* levels are suppressed by Reelin in both wild-type and *Srf* mutant neurones (F). Notably, Reelin induces mRNA levels of various cytoskeletal genes including *Acta* (G), *Filamin A* (H) and *Tropomyosin 2B* (I) depending on SRF. Statistical significance was calculated by comparing values of control with respective Reelin- or BDNF- containing media.

Supplemental Figure S5

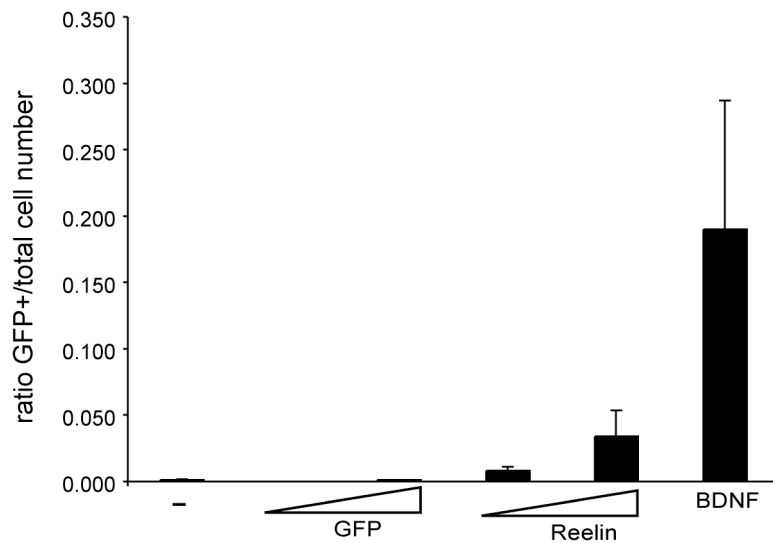


Reelin stimulates IEG and *Flna* gene expression

Wild-type or SRF-deficient cortical neurons were stimulated for 30 mins with tissue culture supernatants derived from cells secreting either Reelin or expressing GFP (control) which were subsequently concentrated ten-fold using centricon spin columns.

Reelin addition significantly enhances mRNA levels of the IEGs *Egr1* and *Egr2* and the actin cytoskeletal gene Filamin A (*Flna*). In addition, *Srf*, *c-fos* and *Cyr61* are also up-regulated upon Reelin addition, albeit statistically not significantly. In *Srf* mutants, Reelin fails to induce mRNA levels of the aforementioned genes, indicating that Reelin's impact on gene transcription is largely SRF-dependent.

Supplemental Figure S6



Reelin enhances SRF-dependent reporter gene activity

Cortical neurons were transfected with an SRF-dependent reporter gene construct driving EGFP-PEST expression via three SRF binding sites derived from the *c-fos* promoter (p3DA-d2EGFP, a kind gift of Dr. G. Posern, MPI Munich, Germany). Neurons were subsequently left untreated (-) or stimulated with GFP-, Reelin- or BDNF-containing media for 4h. Numbers of GFP-positive cells were normalised to the total number of DAPI-positive cells present.

Untreated cells or cells kept in the original culture medium resulted in almost no GFP-positive neuron. Contrastingly, increasing concentrations of Reelin elevated numbers of GFP-positive neurons indicating that Reelin enhances SRF-dependent reporter gene expression. BDNF was used as a positive control resulting in strongest induction of GFP-positive cells. In contrast to Reelin, derived from HEK293 cell supernatants, commercially available BDNF was completely purified and added at high concentrations (10 ng/ml).

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Christine Carina Stritt, geb. Fiedler
Geburtsdaten	geboren am 16.06.1980 in Rottweil
Familienstand	verheiratet (2006)
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulische Ausbildung

09/1987 – 07/1991	Grundschule Sulgen am Kirchplatz
09/1991 – 07/2000	Gymnasium Schramberg Abschluss: Abitur mit den Leistungsfächern Biologie und Französisch

Universitäre Ausbildung

10/2000 – 02/2006	Studium der Biologie an der Eberhard Karls Universität Tübingen <i>Studienschwerpunkte:</i> <ul style="list-style-type: none">• Molekulare Zellbiologie (Hauptfach)• Mikrobiologie, Pharmakologie (Nebenfächer)
04/2005 – 02/2006	Diplomarbeit am Interfakultären Institut für Zellbiologie, Abt. Molekularbiologie der Eberhard Karls Universität in Tübingen (Leitung Prof. Dr. Alfred Nordheim) <i>Titel der Diplomarbeit:</i> Identifizierung von Zielgenen des Transkriptionsfaktors SRF im Gehirn der Maus Betreuung durch Dr. Bernd Knöll Abschluss: Diplom-Biologin Note: sehr gut

03/2006 – 10/2009

Promotion am Interfakultären Institut für Zellbiologie, Abt. Molekularbiologie der Eberhard Karls Universität in Tübingen (Leitung Prof. Dr. Alfred Nordheim)

Titel der Dissertation:

Identifizierung neuer Funktionen SRF-vermittelter Genexpression beim Aufbau neuronaler Netzwerke

Betreuung durch Dr. Bernd Knöll

Publikationen

Knoll, B., Kretz, O., **Fiedler, C.**, Alberti, S., Schutz, G., Frotscher, M., and Nordheim, A.: *Serum response factor controls neuronal circuit assembly in the hippocampus. Nature Neuroscience, 2006*

Stritt, C., Stern, S., Harting, K., Manke, T., Sinske, D., Schwarz, H., Vingron, M., Nordheim, A., and Knöll, B.: *Paracrine control of oligodendrocyte differentiation by SRF-directed neuronal gene expression. Nature Neuroscience, 2009*

Stern, S., Debre, E., **Stritt, C.**, Berger, J., Posern, G., and Knöll, B.: *A nuclear actin function regulates neuronal motility by serum response factor-dependent gene transcription. J Neurosci. 2009*

Stritt, C. and Knöll, B.

Reelin signalling and SRF (Serum Response Factor) gene transcription synergise during hippocampal development. Submitted.